

**НАЦІОНАЛЬНИЙ ТЕХНІЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ УКРАЇНИ
«КИЇВСЬКИЙ ПОЛІТЕХНІЧНИЙ ІНСТИТУТ
імені ІГОРЯ СІКОРСЬКОГО»**

Факультет біотехнології і біотехніки

Кафедра промислової біотехнології

До захисту допущено:

Завідувач кафедри

_____ Тетяна ТОДОСІЙЧУК

«___» _____ 2020 р.

Дипломний проєкт

на здобуття ступеня бакалавра

за освітньо-професійною програмою «Промислова біотехнологія»

спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія»

**на тему: «Технологія виробництва бактеріального концентрату закваски для
кисломолочних продуктів. Дільниця виробничого біосинтезу»**

Виконала:

студентка IV курсу, групи БТ-61

Кічура Марія Андріївна _____

Керівник:

Доцент, к.т.н., доцент,

Жолнер Лілія Григорівна _____

Консультант з Розділу 5. Розрахунок обладнання для проведення
технологічного процесу:

Доцент, к.н.т., доцент,

Шибецький Владислав Юрієвич _____

Рецензент:

Асистент, к.т.н, асистент

Левтун Ігор Ігорович _____

Засвідчую, що у цьому дипломному
проєкті немає запозичень з праць інших
авторів без відповідних посилань.

Студентка _____

Київ – 2020 року

ВІДОМІСТЬ ДИПЛОМНОГО ПРОЄКТУ

[illegible]

				ДП 6109 00.000.00		
	ПБ	Підп.	Дата	Відомість дипломного проєкту	Лист	Листів
Розробн.	Кічура М.А				1	1
Керівн.	Жолнер Л.Г				КП ім. Ігоря Сікорського Каф. ПБТ Гр. БТ-61	
Консульт.	Шибецький В.Ю					
Н/контр.						
Зав.каф.	Тодосійчук Т.С.					

Національний технічний університет України
«Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського»

Факультет біотехнології і біотехніки
Кафедра промислової біотехнології

Рівень вищої освіти – перший (бакалаврський)

Спеціальність – 162 «Біотехнології та біоінженерія»

Освітньо-професійна програма «Промислова біотехнологія»

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри

_____ Тетяна ТОДОСІЙЧУК

«_27_» лютого 2020 р.

ЗАВДАННЯ

на дипломний проєкт студенту

Кічурі Марії Андріївні

1. Тема проєкту «Технологія виробництва бактеріального концентрату закваски для кисломолочних продуктів. Дільниця виробничого біосинтезу», керівник проєкту Жолнер Лілія Григорівна, к.т.н, доц., затверджені наказом по університету від «21» травня 2020 р. № 1125-с

2. Термін подання студентом проєкту _____

3. Вихідні дані до проєкту: рекомбінантний штам-продуцент є *L. delbrueckii subsp. Bulgaricus* та *Streptococcus salivarius subsp. Thermophilus*; середовище культивування- молоко; ферментер для промислового культивування - об'єм 1 м³; параметри культивування: $t = 45\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\tau = 7$ год; спосіб очистки продукту – центрифугування; кінцевий продукт – сухий концентрат бактеріальної закваски в пластмасових баночках для харчової промисловості.

4. Зміст пояснювальної записки: підібрати і охарактеризувати продуцент для виробництва концентрату бактеріальної закваски; провести аналіз методів створення високопродуктивних промислових продуцентів, обґрунтувати схему отримання продуценту, що використовується у проєкті; визначити основні фізико-хімічні характеристики кінцевого продукту та біохімічні основи його виробництва; скласти матеріальний баланс виробництва, розробити

технологічну і апаратурну схему; обґрунтувати вибір конструкції ферментеру, здійснити технологічний, конструктивний та тепловий розрахунки.

5. Перелік графічного матеріалу (із зазначенням обов'язкових креслеників, плакатів, презентацій тощо): креслення загального виду ферментеру – 1 арк. А1, технологічна схема – 1 арк. А1, апаратурна схема – 1 арк. А1

6. Консультанти розділів проєкту

Розділ	Прізвище, ініціали та посада консультанта	Підпис, дата	
		завдання видав	завдання прийняв
Розділ 5	Шебецький В.Ю., доцент. каф. біотехніки та інженерії		

7. Дата видачі завдання _____

Календарний план

№ з/п	Назва етапів виконання дипломного проєкту	Термін виконання етапів проєкту	Примітка
1.	Характеристика біологічного агента	01.04.20-14.04.20	
2.	Біохімічні основи виробництва	01.04.20-14.04.20	
3.	Методи отримання промислових продуцентів	01.04.20-14.04.20	
4.	Технологічна частина	14.04.20-22.04.20	
5.	Складання апаратурної схеми	14.04.20-22.04.20	
6.	Розрахунок обладнання для проведення технологічного процесу	28.04.20-15.05.20	
7.	Оформлення пояснювальної записки	15.05.20-10.06.20	

Студент

Марія КІЧУРА

Керівник

Лілія ЖОЛНЕР

**Пояснювальна записка
до дипломного проєкту
на тему: «Технологія виробництва бактеріального
концентрату закваски для
кисломолочних продуктів. Дільниця виробничого
біосинтезу»**

Реферат

Дипломний проект містить 108 сторінок, 10 ілюстрацій, 3 таблиці, 2 креслиники та 109 бібліографічних найменувань за переліком посилань.

Метою даної роботи є проектування виробництва бактеріальної закваски для виготовлення кисломолочних продуктів дієтичного харчування, зокрема йогурту.

Робота присвячена збільшенню обсягів виробництва вітчизняних заквасок, що дасть можливість збільшення асортименту та здешевлення молочнокислих продуктів.

Обґрунтовано і запропоновано в якості продуцента бактеріальної закваски використовувати штами гомоферментативних термофільних молочнокислих бактерій *Lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaricus* та *Streptococcus salivarius subsp. Thermophilus*, отримані у результаті селекції з використанням природнього добору, мають пробітичні властивості і є високотехнологічними для виготовлення кисломолочної пробудкції.

Обрано ефективне, економічно вигідне та надійне обладнання для виробничого культивування закваски. Розраховано та обрано апарат для виробничого культивування. Наведено технологічний, конструктивний та гідравлічний розрахунки обраного ферментеру.

В роботі обґрунтовані та подані технологічна та апаратурна схеми виробництва.

МОЛОЧНОКИСЛІ БАКТЕРІЇ, LACTOBACILLUS DELBRUECKII, STREPTOCOCCUS THERMOPHILUS, КОНЦЕНТРАТ БАКТЕРІАЛЬНОЇ ЗАКВАСКИ, МОЛОЧНОКИСЛЕ БРОДІННЯ, ПОЖИВНЕ СЕРЕДОВИЩЕ, СЕЛЕКЦІЯ, ПРОЦЕС КУЛЬТИВУВАННЯ, КОНЦЕНТРУВАННЯ ЗАКВАСКИ, СТАНДАРТИЗАЦІЯ ГОТОВОЇ ПРОДУКЦІЇ.

Abstract

The diploma project contains 108pages, 10 illustrations, 3 tables, 2 drawings and 109 bibliographic titles according to the list of references.

The purpose of this work is to design the production of bacterial leaven for the manufacture of fermented milk products for dietary nutrition.

The work is devoted to increasing the production of domestic leavens, which will increase the range and reduce the cost of lactic acid products.

It is substantiated and proposed to use strains of homofermentative thermophilic lactic acid bacteria *Lactobacillus delbrueckii* subsp as a producer of bacterial yeast. *Vulgaricus* and *Streptococcus salivarius* subsp. *Thermophilus*, obtained by selection using natural selection, have probiotic properties and are high-tech for the manufacture of fermented milk production.

Efficient, cost-effective and reliable equipment for production cultivation of sourdough has been selected. The device for industrial cultivation is calculated and selected. Technological, constructive and hydraulic calculations of the selected fermenter are given.

The technological and hardware schemes of production are substantiated and presented in the work.

LACTIC ACID BACTERIA, LACTOBACILLUS DELBRUECKII, STREPTOCOCCUS THERMOPHILUS, CONCENTRATE BACTERIAL CULTURES, LACTIC ACID FERMENTATION, CULTURE MEDIA, SELECTION, PROCESS CULTIVATION CONCENTRATION STARTERS, STANDARDIZATION OF FINISHED PRODUCTS.

Зміст

Вступ	9
Розділ 1. Характеристика біологічного агента	11
1.1 Основні просмислові продуценти.....	11
1.2 Морфологічно цитологічні ознаки.....	14
1.3 Фізіолого-біохімічні властивості	12
1.4 Культуральні властивості	20
1.5. Поширення в природі	21
Розділ 2. БІОХІМІЧНІ ОСНОВИ ВИРОБНИЦТВА	24
2.1 Характеристика кінцевого продукту	24
2.2 Схема хімічних перетворень.....	26
2.3. Характеристика компонентного складу біотехнологічного препарату.....	25
2.4. Методи очистки цільового продукту	30
2.5 Механізми впливу цільового продукту на біохімічні процеси	33
РОЗДІЛ 3. МЕТОДИ ОТРИМАННЯ ПРОМИСЛОВИХ ПРОДУЦЕНТІВ	31
3.1. Генетична вивченість продуцентів.....	31
3.1.1. Генетична карта продуценту.....	32
3.1.2. Механізми експресії генів, індукторів та репресорів процесу синтезу.....	38
3.2. Загальні методи створення високопродуктивних промислових продуцентів.....	43
3.2.1. Використання природного та штучного добору для отримання промислових продуцентів.....	46
3.2.2 Використання гібридизації.....	48
3.2.3 Регуляція метаболізму	50
3.3. Схема отримання продуцента, що використовується в роботі	52
РОЗДІЛ 4. ТЕХНОЛОГІЧНА ЧАСТИНА	53
4.1. Характеристика кінцевої продукції виробництва	53
4.2. Характеристика сировини, матеріалів та напівпродуктів, що використовуються у виробництві	55
4.3. Опис технологічного процесу.....	62
4.4. Матеріальний баланс.....	68
4.5. Контроль виробництва.....	71

					ДП 6109. 00.000 ПЗ			
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата				
Розробила		Кічура. М.А			ЗМІСТ	Стадія	Аркуш	Аркушів
Консульт.						Д	7	
						КПІ ім. Ігоря Сікорського		
Керівник		Жолнер /І.І				ФБТ		
Затвер.								

РОЗДІЛ 5. РОЗРАХУНОК ОБЛАДНАННЯ ДЛЯ ПРОВЕДЕННЯ ТЕХНОЛОГІЧНОГО ПРОЦЕСУ	74
5.1. Обґрунтування вибраної конструкції ферментеру для виготовлення закваски	74
5.2. Технологічний, конструктивний, гідравлічний розрахунки	80
5.3. Вибір загальнозаводського обладнання	92
5.4. Вимоги до охорони праці та навколишнього середовища	93
ВИСНОВКИ	97
Список використаних джерел	98

Вступ

За даними Всесвітньої організації охорони здоров'я спостерігається тенденція до погіршення здоров'я населення, що виражається у збільшенні рівня захворюваності населення пов'язаному з проблемами шлунково-кишкового тракту та зниженням імунітету. Це пов'язано, в першу чергу, зі зниженням адаптації організму людини до несприятливих умов навколишнього середовища: дії техногенних факторів, хімічного навантаження, емоційних стресів та інших несприятливих впливів. Тому підвищення стійкості організму людини можна досягнути зокрема шляхом правильного харчування, а саме вживанням кисломолочних продуктів [1].

Як відомо, основним компонентом кисломолочних продуктів є закваска та молоко, що містить штами кисломолочних бактерій, одним з них є *L. delbrueckii subsp. Bulgaricus* та *Streptococcus salivarius subsp. Thermophilus*. Саме заквашувальні культури визначають дієтичні, лікувально-профілактичні, органолептичні властивості ферментованих молочних продуктів, визначають їхню безпечність для споживачів та збереження якісних характеристик упродовж зберігання. Значущість заквашувальних культур обумовлена тим, що під час виготовлення та зберігання продуктів відбувається розвиток та розмноження молочнокислих бактерій, що призводить до перетворення молока на кисломолочні продукти з притаманними для них корисними характерними властивостями. Також відбувається формування специфічної структури та консистенції продуктів, пригнічення розвитку патогенних і умовно-патогенних бактерій в результаті конкуренції за найдоступніші поживні сполуки та утворення специфічних і неспецифічних речовин з антимікробною дією. Такі продукти легше засвоюються організмом і стають рятунком для людей, які мають алергію на лактозу.

					ДП 6109. 00.000 ПЗ			
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	ВСТУП	Стадія	Аркуш	Аркушів
Розробила		Кічура. М.А				Д	9	
Консульт.								
6 Керівник		Жолнер /І/					КПІ ім. Ігоря Сікорського	
Затвер.							ФБТ	

Розробками технології бактеріальних заквасок займаються в багатьох країнах (США, країни ЄС, Нова Зеландія, Австралія, Китай, Росія, Україна). В Україні відомо шість основних заводів, що виготовляють закваски. А саме ViVO, Good food, Genesis, Lacte, Симбітер, Іпровіт, та інші. Згідно зі статистичними даними, Україна виготовляє лише 3,6 тис.тон на рік бактеріальних заквасок. Треба відмітити, що за останній рік імпорт вітчизняних заквасок зріс на 8%, а експорт скоротився на 10%. Обсяг виробництва кисломолочної продукції в світі складає близько 50 млн.тон на рік, бактеріальних заквасок 15 млн. тон на рік. [2].

В зв'язку з цим є необхідність в збільшенні обсягів виробництва вітчизняних заквасок, що дасть можливість збільшення асортименту та здешевлення молочнокислих продуктів.

Метою даної роботи є проектування виробництва бактеріальної закваски для виготовлення кисломолочних продуктів дієтичного харчування, зокрема йогуртів.

В результаті виконання дипломної роботи повинні бути вирішені наступні завдання:

- надати характеристику основних та альтернативних продуцентів цільового продукту;
- описати біохімічні основи виробництва бактеріальних заквасок;
- описати методи створення високопродуктивних штамів;
- розробити принципову технологічну схему виробництва бактеріальної закваски;
- скласти апаратурну схему виробництва продукту;
- підібрати та розрахувати основні параметри апарату для виробничого біосинтезу бактеріальної закваски.

Розділ 1. Характеристика біологічного агента

1.1 Основні просмислові продуценти

Склад мікрофлори бактеріальної закваски підбирають таким чином, щоб забезпечити для кожної групи продуктів необхідні смак, запах, консистенцію. Закваска для йогурту, складається з термофільного стрептокока і болгарської палички. Цих два мікроорганізми входять в симбіоз при спільному зростанні на поживному середовищі. Було доведено, що *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus* виділяє вуглекислий газ в ході свого метаболізму, а *Lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaricus* використовує його для розвитку. Також при спільному культивуванні регулюється засвоєння азотистих сполук у *Streptococcus thermophilus*, що позитивно впливає на ріст та розвиток бактерій. Також при використанні цих два мікроорганізми в заквасках для йогурту можна зменшити кількість стабілізаторів, оскільки дослідження показали, що при підвищенні концентрації екзополісахаридів підвищується в'язкість йогурту [3].

Ці два мікроорганізми відносяться до гомеоферментативних бактерій. Гомеоферментативні молочнокислі бактерії перетворюють один моль глюкози на два моля молочної кислоти, тоді як гетероферментативні молочнокислі бактерії перетворюють один моль глюкози в один моль молочної кислоти та безліч інших продуктів, таких як оцтова кислота, етанол і CO₂ [4].

У термофільної заквасці для йогурту окрім *Streptococcus thermophilus* та *Lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaricus* можуть також знаходитися такі мікроорганізми, як: *Lactobacillus acidophilus*; *Lactobacterium lactis*; *Lactobacterium helveticum*.

Streptococcus thermophilus має довгі ланцюжки, що складаються з грампозитивних кулястих або еліпсоподібних клітин. Особливою

					ДП 6109. 00.000 ПЗ			
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	Розділ 1. Характеристика біологічного агента	Стадія	Аркуш	Аркушів
Розробила		Кічура. М.А				Д	11	
Консульт.						КПІ ім. Ізгоря Сікорського		
Керівник		Жолнер Л.І				ФБТ		
Затвер.								

ознакою даного мікроорганізму є великий діапазон температур зростання- від 20 до 50° С, але оптимальна становить 37 - 40 ° С.

За енергією кислотоутворення перевершує всі молочнокислі стрептококи, так як він сквашує молоко *тін* через 3,5 годин і *тах* через 6 годин. При цьому гранична кислотність дорівнює 115 ° Т.

Str. Thermophiles дуже чутливий до різних антибіотиків, особливо до пеніциліну, тому його використовують як тест-мікроорганізм для виявлення антибіотиків в молоці [5].

Lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaricus- найпопулярніша лактобактерія у виробництві заквасок, відома завдяки роботам І.І. Мечникова. Являє собою довгі палички і є гомоферментативні. Температура її розвитку становить 45 ° С. Вона доводить граничну кислотність молока до 200 - 300 ° Т. Штами даної палички утворюють ацетальдегід, який є ароматичною речовиною. Він позитивно впливає на органолептичні показники і пригнічує небажану мікрофлору в шлунково-кишковому тракті у людини. Також продукує молочну кислоту, що має антагоністичні властивості. Штами болгарської палички виділяють з сирого молока. Вона чутлива до антибіотиків і стійка до бактеріофагу [6].

Lactobacillus acidophilus-ацидофільна паличка являє собою палички різної довжини, вони можуть бути, як і поодинокі, так і складати ланцюжки. Ідеальною температурою розвитку вважається 37 ° С. Дана паличка утворює кислоти більше, ніж болгарська. Вона швидше нейтралізує отруйні продукти життєдіяльності патогенних мікроорганізмів. Гранична кислотність *Lbm.acidophilum* дорівнює 200 - 250 ° С [7].

Lactobacterium lactis - довгі нитки, які розташовуються парами, у вигляді зернистих ланцюжків. Оптимальною температурою розвитку даної бактерії є 40 градусів. *Lactobacterium lactis* має ферментативну активність і завдяки цьому відмінно зброжує лактозу, сахарозу, глюкозу та ін. Гранична

					ДП 6109. 00.000 ПЗ	Арк.
4						12
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

кислотність - 110 - 180 ° С [8].

Lactobacterium helveticum -зустрічається в сирому молоці. Являє собою довгі палички, які розташовуються у вигляді окремих клітин або ланцюжків. Оптимальна температура розвитку 40°C. Зброжує такі вуглеводи, як: мальтозу і декстрин. Максимальна кислотність молока може досягати 350 ° С[9].

Враховуючи все вище сказане, як основні промислові продуценти було обрано *Lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaricus* та *Streptococcus thermophilus* для одержання молочнокислої закваски, що може використовуватися для виготовлення молочнокислих продуктів.

Встановлено, що згідно визначника бактерій Берджі штаб *Lactobacillus delbrueckii TUA4408L*, який в подальшому планується до використання відноситься до групи 19 «Грампозитивні неспороутворюючі палички правильної форми». Клітини бактерій з'єднані в ланцюжки, які в рідкому середовищі мають середній розмір 3 бацили. Розмір клітин - 0,5-1,2 × 3,0-10,0 мкм.

Також як потенційні продуценти можна використовувати *Lac. Lactis*; *Lac. Cremoris*; *Leu.cremoris*; *Lac. Diacetylactis*; *Leu. Dextranicum*

Рід *Lactobacillus* належить до філи *Firmicutes*, класу *Bacilli*, порядку *Lactobacillales*, сімейству *Lactobacillaceae*.

Домен *Bacteria*

Філа XIII. *Firmicutes*

Class I. *Bacilli*

Порядок II. *Lactobacillales*

Сімейство I. *Lactobacillaceae*

					ДП 6109. 00.000 ПЗ	Арк.
4						13
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

Рід I. *Lactobacillus*

Рід II. *Paralactobacillus*

Рід III. *Pediococcus*

Встановлено, що згідно визначника бактерій Берджі *S. thermophilus* ACA-DC 2 відноситься до групи 17 «Грампозитивні неспороутворюючі коки». Клітини бактерій з'єднані в ланцюжки. Розмір клітин - 0,6-1 мкм.

Рід *Streptococcus* належить до філи *Firmicutes*, класу *Bacilli*, порядку *Lactobacillales*, сімейству *Streptococcaceae*

Домен *Bacteria*

Філа XIII. *Firmicutes*

Class I. *Bacilli*

Порядок II. *Lactobacillales*

Сімейство I. *Streptococcaceae*

Рід I. *Streptococcus*

1.2 Морфологічно цитологічні ознаки

Морфологічно цитологічні ознаки *L. delbrueckii subsp. bulgaricus*,

Як зазначалося раніше основним збудником молочнокислого бродіння в промисловості є *Lactobacillus delbrueckii*. Вона була відкрита Лейхманом ще в 1896 р і названа ним на честь відомого мікробіолога М. Дельбрюка *Bacillus derbricki*. Молочнокислі бактерії позитивно забарвлені по Граму, характерна наявність включень: зерен волютини (метахроматину, поліфосфатних гранул). Це нерухомі факультативні анаероби, що не утворюють спор. Палички великі, довжиною 7-8 мкм, товщиною 0,5-0,8 мкм, що утворюють, як правило, короткі ланцюжки з 2-4 клітин Рисунок 1.1. [10].

					ДП 6109. 00.000 ПЗ	Арк.
4						14
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

Lactobacillus delbrueckii утворюють екзополісахариди (extracellular polysaccharides, EPS), які бувають двох видів . Склад: найчастіше декстран, глюкан, леван. Можуть містити регулярно повторювані одиниці. Особливості біосинтезу-синтез індукується додаванням сахарози в середовище. Синтезуються в невеликих кількостях (0.1-1.5 г / л) з нуклеотид-активуючих попередників.

Іноді EPS лактобацил представлені капсулою. Так, капсула діаметром 1.5-3 мкм виявлена у бактерій *L. delbrueckii subsp. bulgaricus*, виділених з йогурту і *L. kefiranofaciens*, виділених з кефірного зерна. Завдяки здатності утворювати EPS *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* застосовуються у виробництві йогурту, вони забезпечують необхідну текстуру цього харчового продукту. EPS *L. kefiranofaciens* утворюють матрикс, званий «кефірний зерном», який служить екологічної нішею для мікробного співтовариства дріжджів і лактобацил [11].

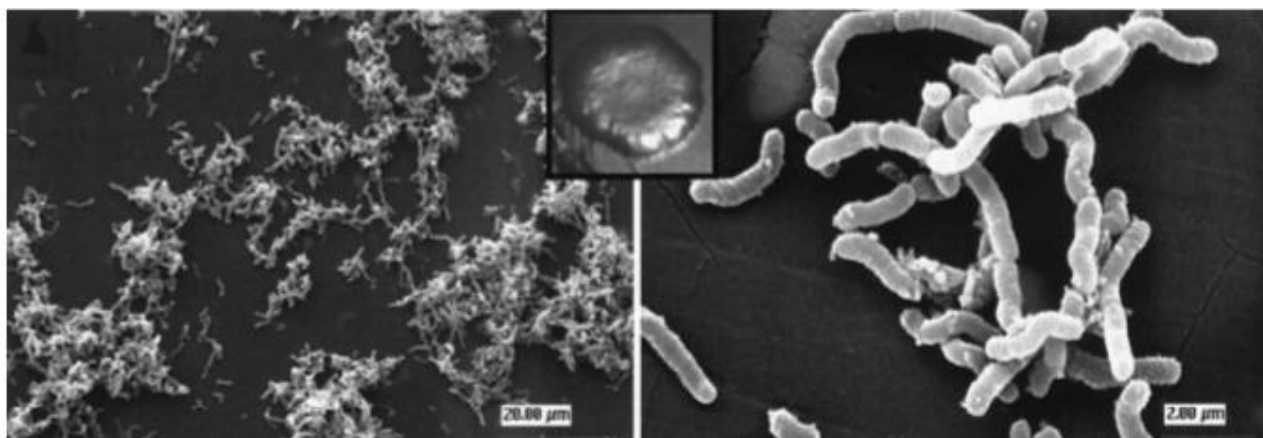


Рисунок 1.1. Скануюча електронна (зліва) і світлова(справа) мікроскопія клітин *L. delbrueckii subsp. Bulgaricus*.

Морфологічно цитологічні ознаки *Streptococcus thermophilus*

Streptococcus salivarius ssp. thermophilus - клітини мають овальну або кулясту форму. Діаметр кожного кока в середньому 0,6-1 мкм, однак для них характерний поліморфізм: зустрічаються дрібні і великі коки, строго кулясті і

овальні Рисунок 1.2. Стрептококи розташовуються ланцюжками, що є результатом поділу їх в одній площині. Довжина ланцюжків різна. На щільному поживному середовищі ланцюжки зазвичай короткі, на рідких - довгі. Стрептококи нерухомі, не мають ендоспор . Свіжовиділені культури іноді утворюють капсулу. На ультратонких зрізах видна мікрокапсула, під нею розташована тришарова клітинна стінка і тришарова цитоплазматична мембрана. Вони нерухомі, грампозитивні, факультативні анаероби[12] .

Streptococcus thermophilus утворюють екзополісахариди (extracellular polysaccharides, EPS). Склад: найчастіше декстран, глюкан, леван. Можуть містити регулярно повторювані одиниці. Особливості біосинтезу-синтез індукується додаванням сахарози в середовище. Синтезуються в невеликих кількостях (0.1-1.5 г / л) з нуклеотид-активуючих попередників. Найчастіше представлені капсулою[13].

Біополімери цих бактерій здатні підвищувати продукування імунокомпетентними клітинами прозапальних цитокінів, таких як інтерлейкін-1а (ІЛ 1а) і фактор некрозу пухлини (ФНП-а), що грають важливу роль в активації макрофагів і лімфоцитів.

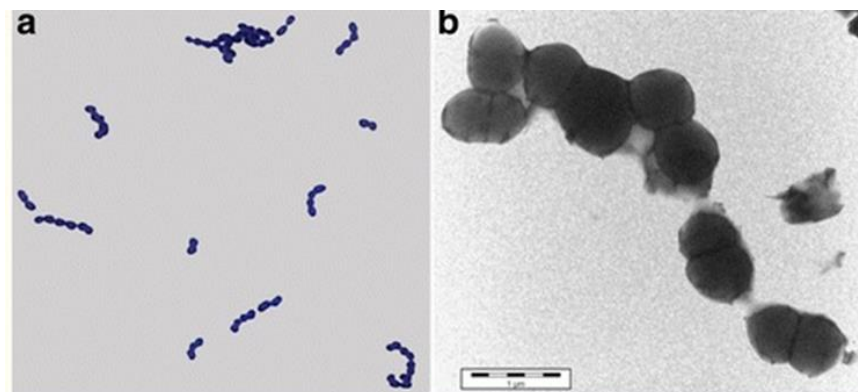


Рисунок 1.2. Мікроскопія клітин *Streptococcus thermophilus*

1.3 Фізіолого-біохімічні властивості

Фізіолого-біохімічні властивості *L. delbrueckii subsp. Bulgaricus*

					ДП 6109. 00.000 ПЗ	Арк.
4						16
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

Особливістю конструктивного метаболізму *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* є слаборозвинені біосинтетичні здібності, як наслідок, сильна залежність росту від наявності готових органічних речовин (амінокислот, вітамінів групи В, компонентів нуклеїнових кислот). Це свідчить про примітивність їх конструктивного метаболізму і про появу даних бактерій на ранніх стадіях розвитку життя на Землі.

Культивування молочнокислих бактерій на синтетичних середовищах не вдається; це - типова сушлова культура. *L. delbrueckii* вимогливі до азотного живлення. Набір необхідних амінокислот ретельно не вивчений, але, як і більшості молочнокислих бактерій, їм необхідний аргінін, цистеїн, глютамінова кислота, лейцин, фенілаланін, триптофан, тирозин і лізин, а, можливо, ще й деякі інші. З вітамінів необхідні рибофавін, нікотинова або фолієва кислота; тіамін пригнічує утворення молочної кислоти. Потреба у вітамінах залежить від температури культивування, рН. Для молочнокислих бактерій потрібні натрій, калій, фосфор, мідь, залізо, сірка, магній і особливо марганець. Цинк прискорює ріст бактерій, але пригнічує утворення молочної кислоти. До цукровмісних середовищ запропоновано додавати: сухі паростки (корінці) ячмінного, житнього і пшеничного солоду, осадові винні і спиртові дріжджі, дріжджевий автолізат, пшеничні зародки, молоко, сухий порошок хлорели і т.д. Зазвичай користуються сухими ячмінними паростками [14]. Солодові паростки містять до 30% азотистих речовин, близько половини яких розчиняється в воді. З амінокислот в паростках знайдено: аспарагінова і глютамінова кислоти, аргінін, гістидин, лізин, серин, глікокол, треонін, аланін, валін, метіонін, лейцин, ізолейцин, В-фенілаланін, пролін. Аміди представлені головним чином аспарагін. З вуглеводів, крім клітковини і геміцелюлози, міститься близько 20% глюкози і фруктози, трохи мальтози. У паростках наявна основна маса вітамінів і біостимуляторів пророслого зерна (рибофлавін, піридоксин, ціанокобаламін, нікотинова і пантотенова кислоти, токоферол, інозит, біотин). Недоліком солодових паростків є сильне вбирання вологи і набухання, що підвищує в'язкість культуральної рідини і погіршує подальше

					ДП 6109. 00.000 ПЗ	Арк.
4						18
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

відділення паростків фільтруванням. Паростки повинні бути жовтого або коричневого кольору, з хлібно-солодовим запахом, гіркуваті на смак. За технічними умовами допускається вміст зернової домішки 5-6%, мінеральної не більше 0,5%, вологість не вище 10%. Обробка паростків 6% -ним розчином молочної кислоти протягом 2 ч або пастеризація в живильному середовищі 1 ч дає гірші результати, ніж непастеризовані паростки: не тільки збільшується тривалість бродіння, але знижується вихід молочної кислоти, збільшується вміст незбродженого цукру. Це відбувається тому, що внаслідок низького рН (1,8-2,0) в 6% -ому розчині молочної кислоти інактивуються протеолітичні ферменти паростків, а при температурі 70 °С фактори росту руйнуються [15]

Оптимальне для росту бактерій рН знаходиться близько 5,5, може змінюватися від складу середовища, її його концентрації, температури зброджування і штаму молочнокислих бактерій. При рН 4,5 розвиток бактерій затримується, при рН 3,0 - припиняється. Молочнокислі бактерії краще розвиваються при рН 5,8-6,0, але з'являється ймовірність зараження сторонніми бактеріями. При рН 7 і вище живильне середовище втрачає захисні властивості та інфікується. Молочнокислі бактерії не мають гемінової системи, водень переноситься не на молекулярний кисень, як у аеробів, а на органічні сполуки, що утворюються в процесі бродіння (пировиноградную кислоту, а, можливо, на 4-фосфогліцерінову кислоту). *L. delbruckii* дуже чутливі до кислотності середовища, тому при накопиченні молочної кислоти її нейтралізують крейдою. Кислотність підтримують на рівні 0,3-0,4%. Лактат кальцію, що утворюється при нейтралізації кислоти, повинен знаходитися в розчиненому стані, розчинність його зростає з підвищенням температури середовища і при 50 ° С становить 15- 16%. Отже, температура не тільки створює селективні умови для розвитку молочнокислих бактерій, але і сприяє більшому накопиченню лактату. [16].

					ДП 6109. 00.000 ПЗ	Арк.
4						18
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

Фізіолого-біохімічні властивості *Streptococcus thermophilus*

Streptococcus thermophilus переважно зброжує глюкозу, сахарозу, фруктозу, рафінозу, лактозу. Швидкість сквашування молока - 8 годин, межа кислотоутворення - 211 ° Т. Оптимальне для росту бактерій рН знаходиться близько 5,5, може змінюватися від складу середовища, її його концентрації, температури зброджування і штаму молочнокислих бактерій. При рН 4,5 розвиток бактерій затримується, при рН 3,0 - припиняється. Молочнокислі бактерії краще розвиваються при рН 5,8-6,0, але з'являється ймовірність зараження сторонніми бактеріями. При рН 7 і вище живильне середовище втрачає захисні властивості та інфікується. Оптимальна температура для зростання в молоці 37-45 ° С. Також може зрости в молоці, що містить метиленовий блакитний (0,01%). Витримує нагрівання протягом 30 хв при температурі 55 ° С, 60 ° С [17]

Продукт, який синтезується - молочна кислота, антибіотичні речовини.

Антибіотична активність:

- діаметр зони пригнічення росту по відношенню до представника патогенної мікрофлори *Staphylococcus aureus* становив 17 мм;
- діаметр зони пригнічення росту по відношенню до представника умовно-патогенної мікрофлори *Escherichia coli* становить 18 мм.

Streptococcus thermophilus вимогливі до азотного живлення. Набір необхідних амінокислот достатньо не вивчений, але, як і більшості молочнокислих бактерій, їм необхідний аргінін, цистеїн, глютамінова кислота, лейцин, фенілаланін, триптофан, тирозин і лізин, а, можливо, ще й деякі інші. З вітамінів необхідні рибофавін, нікотинова або фолієва кислота; тіамін пригнічує утворення молочної кислоти. Для молочнокислих бактерій потрібні натрій, калій, фосфор, мідь, залізо, сірка, магній і особливо марганець. Цинк прискорює ріст бактерій, але пригнічує утворення молочної кислоти. До цукровмісних середовищ запропоновано додавати: сухі паростки (корінці)

					ДП 6109. 00.000 ПЗ	Арк.
4						20
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

ячмінного, житнього і пшеничного солоду, осадові винні і спиртові дріжджі, дріжджевий автолізат [18].

1.4 Культуральні властивості

Культуральні властивості *L. delbrueckii subsp. bulgaricus*

L. delbrueckii subsp. bulgaricus на щільних поживних середовищах лактобацили формують куґлі колонії, гладкі, непрозорі, іноді блискучі, опуклі, з хвилястими контурами. Зазвичай колонії дрібні, 4 мм в діаметрі. Колонії як правило білі або злегка кремового кольору. *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* здатні утворювати позаклітинні нуклеази при вирощуванні на агарі, що містить ДНК або РНК [19]. При глибинному посіві на тверде живильне середовище утворюються щільні колонії у вигляді правильних лінз (сочевицеподібні), трикутної і неправильної форми. Якщо в середовище додати крейду, то навколо колоній внаслідок накопичення молочної кислоти утворюється зона розчинення крейди Рисунок 1.3.

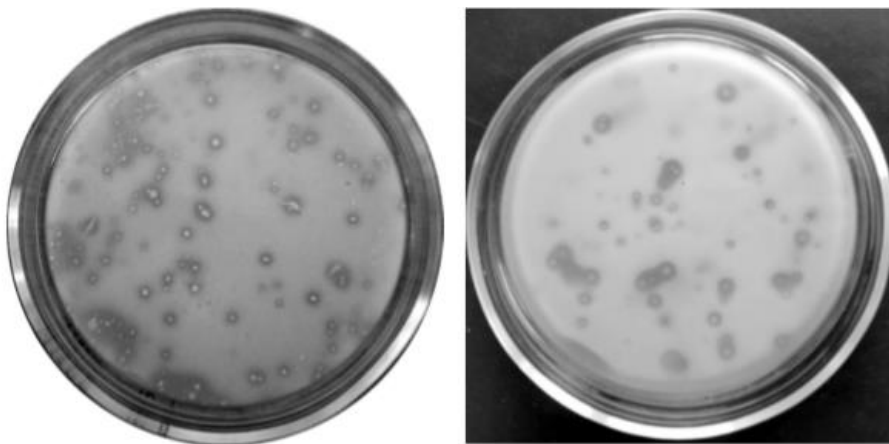


Рисунок 1.3 Колонії *L. delbrueckii subsp. Bulgaricus* на калусному агарі.

Хороший розвиток бактерій спостерігається в напіврідкому поживному середовищі, що містить 0.15-0.75% агару, а невеликі концентрації агару забезпечують низький окислювально-відновний потенціал середовища і

створюють сприятливі мікроаерофільні умови.

При зростанні на рідких поживних середовищах лактобацили найчастіше викликають рівномірне помутніння, незабаром після припинення росту осідаючи у вигляді рівного гомогенного шару[20].

Культуральні властивості *Streptococcus thermophilus*

На поверхні агаризованому середовища (MRS агарі) через 24 години при температурі 42 ° С утворюють: колонії округлої форми, зазвичай колонії дрібні, 4 мм в діаметрі. Характер контуру краю – гладкий, профіль – опуклий. Колонії як правило білі або злегка кремового кольору. Структура дрібнозерниста, консистенція - м'яка.

Чутливий до вмісту в середовищі NaCl і антибіотиків: він не росте в середовищі з вмістом 4% NaCl і 0,01 МО / см³ пеніциліну Рисунок 1.4. [21]

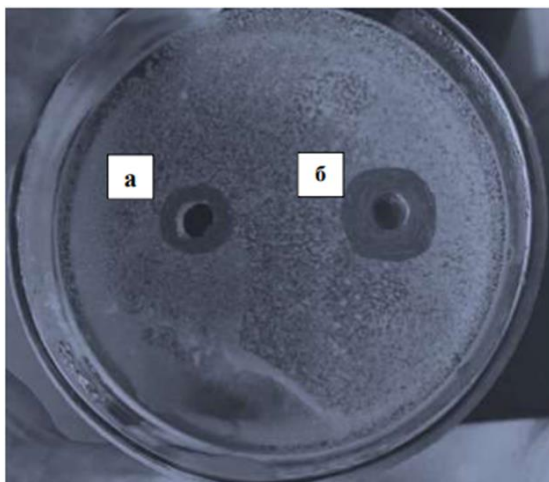


Рисунок 1.4. Колонії *Streptococcus thermophilus*

1.5. Поширення в природі

Молочнокислі бактерії *Streptococcus thermophilus* та *L. delbrueckii* широко поширені в природі. Як правило, вони зустрічаються в умовах надлишку вуглеводів, наприклад, в харчових продуктах (молочних продуктах, ферментованому м'ясі, хлібобулочних виробках) і субстратах рослинного походження. Крім того, вони займають багато ніш всередині і на поверхні тіла людини, наприклад в респіраторному, шлунково-кишковому середовищах.

					ДП 6109. 00.000 ПЗ	Арк.
4						21
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

Рослини і рослинні залишки

Молочнокислі бактерії виявляються на всій поверхні рослин, в ризосфері і в прикореневій зоні. У великих кількостях вони присутні в рослинних рештках, особливо на гниючих фруктах. Відомо, що забрудненість рослин лактобацилами сильно детермінована умовами їх зростання.

Бактерії *L. plantarum* найбільш часто висіваються з рослин. На рослинах були виявлені представники видів *L. fermentum*, *L. brevis*, *L. casei*, *L. salivarius*, *L. buchneri*, *L. coryniformis*, *L. paracasei*, *L. curvatus*, *L. sakei* і *L. fermentum*. Відповідно до теорії Т. Хига, лактобацили входять в число так званих «ефективних мікроорганізмів» (ЕМ, Effective Microorganisms), які роблять позитивний вплив на рослини і сприяють більш високим врожаям. Лактобацили дійсно ефективні проти біотичних стресорів завдяки своїй високій антагоністичної активності щодо рослинних патогенів, лактобацили захищають рослини від біотичних стресів. Вони присутні в ферментованих харчових продуктах рослинного походження (кислій капусті, солоних огірках і ін.) , а також в напоях (пиві, вині, соках).

Lactobacillus, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, грають ключову роль в отриманні силосу. Причому на останніх стадіях дозрівання (після зниження рН нижче 5.5) лактобацили домінують в силосної мікрофлорі. Виявлено, що процес силосування починається гомоферментативними лактобациллами.

Молоко і молочні продукти

Свіже молоко не містить лактобацил, але вони швидко потрапляють в нього з повітря, з інструменту та посуду. Стрептококи випереджають лактобацили за швидкістю зростання, тому титр лактобацил низький навіть в скислому молоці. Але з часом лактобацили починають переважати через більшу стійкість до кислого середовища. Лактобацили містяться в різних кисломолочних продуктах (сирі, йогурті, кефірі та ін.), куди їх зазвичай додають спеціально при виготовленні харчового продукту. Також вони здатні викликати псування

					ДП 6109. 00.000 ПЗ	Арк.
4						22
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

харчових продуктів[22]

Шлунково-кишковий тракт людини

Молочнокислі бактерії є важливим компонентом мікрофлори організму людини: їх вдається виявити в грудному молоці людини. Але основним середовищем існування лактобацил в організмі є різні відділи шлунково-кишкового тракту, починаючи з ротової порожнини і завершуючи прямою кишкою, при цьому максимальна їх кількість спостерігається в товстому кишечнику. У ротовій порожнині вміст лактобацил становить менше 10³-10⁴ КУО / г, шлунку - 10²-10³ КУО / мл шлункового соку, в тонкій кишці - до 10³-10⁴ КУО /мл кишкового соку, в товстій (в залежності від віку) - до 10⁹ КУО /г фекалій.

У дванадцятипалій і порожній кишці лактобацили разом з ентерококами відносяться до домінуючої мікрофлори. У клубовій кишці і товстому кишечнику лактобактерії в кількісному відношенні поступаються іншим мешканцям кишечника (біфідобактеріям, ентеробактеріями і ін.), Але їх метаболічні функції роблять особливо значущою цю популяцію. Лактобацили мають антагоністичну активність відносно патогенних мікроорганізмів і виконують імуномодулюючу функцію. В цілому, більшість видів лактобацил в кишечнику людини відноситься до транзиторної мікрофлори, отже, їх склад і чисельність значною мірою залежать від харчування[23].

					ДП 6109. 00.000 ПЗ	Арк.
4						23
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

2. БІОХІМІЧНІ ОСНОВИ ВИРОБНИЦТВА

2.1 Характеристика кінцевого продукту

Під бактеріальними заквасками розуміють види і штами молочнокислих бактерій, що застосовуються у виробництві кисломолочних продуктів, сиру, кисло-вершкового масла і сирів. Назва «закваска» походить від слів «квасити» або «сквашувати», тобто підвищувати кислотність молока з метою отримання згустку.

Класифікація заквасок:

За фізіологічного стану мікрофлори бактеріальні закваски можна розділити на консервовані, в яких мікрофлора перебуває в стані анабіозу, і активні. Перші виробляють централізовано з використанням в якості консервуючого фактора найчастіше дегідратацію (висушування) або заморожування. Сухі закваски мають високу стійкість, що дозволяє їх транспортувати на великі відстані і зберігати до трьох і більше місяців на заводах. Виробляють також рідкі закваски, в яких як консервуючого фактора використовують 10-20% -ний розчин гліцерину і високі концентрації сухих речовин молока, але вони мають більш низьку стійкість в зберіганні і тому можуть транспортуватися тільки на короткі відстані. Консервовані закваски використовують як посівний матеріал для приготування активних заквасок[24].

Реактивацію і розмноження проводять в молоці або сприятливих для зростання мікрофлори заквасок середовищах, які готують на молочній основі. Приготування бактеріальних заквасок на немолочних середовищах, наприклад, на середовищах, в яких джерелом енергії є не лактоза, а глюкоза, може привести до накопичення біомаси неактивних в молоці клітин молочнокислих бактерій, які не зброджуючи лактозу.

					ДП 6109. 00.000 ПЗ			
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата				
Розробила	Кічура М.А				РОЗДІЛ 2. БІОХІМІЧНІ ОСНОВИ ВИРОБНИЦТВА	Стадія	Аркуш	Аркушів
Консульт.						Д	24	111
						КПІ ім. Ігоря Сікорського		
Керівник	Петров О.Г					ФБТ		
Затвер.								

Активні бактеріальні закваски, які вносять в молоко, підготовлене для одержання кисломолочних продуктів або сиру, називають виробничими, а ті, які за активністю мікрофлори можна використовувати як виробничі, але біомаса яких недостатня, для переробки запланованої кількості молока, - пересадковими.

Закваски, вирощувані спеціальними науково-виробничими лабораторіями, називають матковими або лабораторними. Вони є основою для отримання виробничих або споживчих заквасок. Споживчі закваски підрозділяють на материнські, або первинні; проміжні, або вторинні, і виробничі, або третинні [25].

Материнські закваски отримують при посівах маткових заквасок. Проміжні і виробничі відповідно при посівах материнських і проміжних заквасок .

Розрізняють одноштамові закваски, що складаються з одного штаму мікроорганізму та багатоштамові з декількох штамів одного виду і змішані закваски, до складу яких входять багато штамів різних видів бактерій[26].

По складу мікрофлори основні закваски, застосовувані в молочній промисловості, підрозділяють на 3 групи: бактеріальні, грибкові та залежні від оптимальної температури розвитку змішані. Кисломолочні мікроорганізми бувають: термофільні, мезофільні, психрофільні [27].

За кордоном закваски, що складаються з мезофільних молочнокислих стрептококів, ділять на 5 груп: так звані нульові (0), L, D, LD і ароматичні закваски. Нульові закваски містять тільки *Lac. lactis* і *Lac.cremoris* або штами одного з цих видів. Селекція штамів цих заквасок спрямована на активне кислоутворення і мінімальне газоутворення. Закваски L складаються з нульових заквасок, також *Leu. cremoris*. Наряду з молочною кислотою закваска виробляє діацетил, ацетоін, летючі кислоти і CO₂. У заквасках D крім представників нульових заквасок міститься *Lac. diacetylactis*.

					ДП 6109. 00.000 ПЗ	Арк.
4						25
Зм.	Арк.	№	Підпис	Дата		

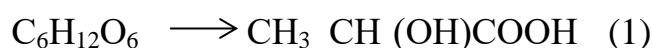
Ці закваски виробляють діацетил і ацетоін у великій кількості, в них більш інтенсивно утворюється CO₂. Закваски LD складаються з молочнокислих стрептококів, що входять до складу нульових заквасок, а також *Leu. cremoris* і *Lac. Diacetylactis* і колонії *L. delbrueckii*. У цих заквасках простежується тенденція *Lac. diacetylactis* домінувати над іншими мікроорганізмами. Так звані ароматичні закваски складаються з штамів *Leu. dextranicum*, *Leu. cremoris*, *Lac. diacetylactis*, що застосовуються для стимулювання ароматоутворення в певних продуктах [28].

У даному проекті буде описана технологія термофільної, сухої, двоштамової LD закваски для виробництва йогурту.

2.2.Схема хімічних перетворень

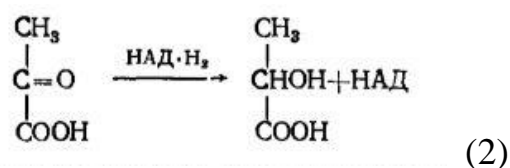
Молочнокисле бродіння відомо з давніх часів. Цей вид бродіння вперше вивчив Л. Пастер в 1857 р і встановив його біологічну природу. *L. delbrueckii subsp. Bulgaricus* та *Streptococcus thermophilus* утворюють в результаті бродіння переважно молочну кислоту (85% і більше) і невеликі кількості фумарової та бурштинової, летючих кислот, етилового спирту і вуглекислого газу. Вони використовують метаболічний шлях Ембдена-Мейергофа-Парнаса (гліколіз) для утворення 2 молей лактату з кожного моля глюкози. При цьому синтезується 2 молекули АТФ Рисунок 2.1. Оптична активність утвореного лактату відрізняється у різних видів і залежить від стереоспецифічності лактатдегідрогенази (ферменту, що каталізує відновлення пірувату до лактату), а також від того, чи містить клітина лактатрацемазу, що перетворює D-лактат в L-форму. *L. delbrueckii subsp. Bulgaricus* утворює ендомер лактату -D-лактат [29].

Гомоферментативне молочнокисле бродіння виражається сумарною хімічною реакцією:

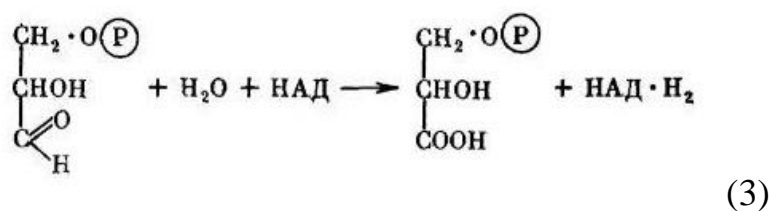


					ДП 6109. 00.000 ПЗ	Арк.
4						26
Зм.	Арк.	№	Підпис	Дата		

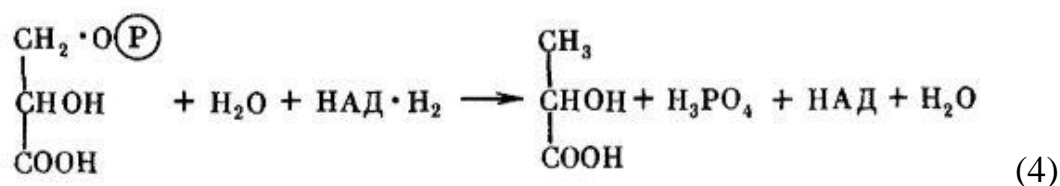
В дійсності воно відбувається складніше. Спочатку в результаті гліколізу з однієї молекули моносахариду утворюються дві молекули піровиноградної кислоти і дві молекули НАД*Н₂. (Піровиноградна я кислота перетворюється в оцтовий альдегід, як при спиртовому бродінні, так як молочнокислі бактерії позбавлені фермента піруваткарбоксилази. Тому не оцтовий альдегід, а сама піровиноградна кислота приймає водень від відновленої форми НАД*Н₂ і перетворюється в молочну кислоту[30]:



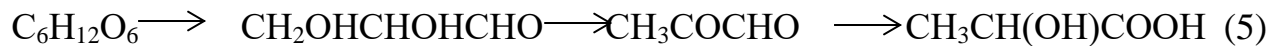
Реакція каталізується ферментом лактатдегідрогеназою. За В. Н. Шапошніковою молочна кислота утворюється не через піровиноградну кислоту, а безпосередньо з 3-фосфогліцерінового альдегіду шляхом окислення його альдегідної групи і відновлення спиртового гідроксилу. Молочнокисле гомоферментативне бродіння йде в дві стадії. В першу з них, в експоненційній фазі росту бактерій, 3-фосфогліцеріновий альдегід окислюється в 3-фосфогліцерінову кислоту з одночасним відновленням НАД:



У другій стадії паралельно з утворенням НАД*Н₂, відбувається поступове зниження γН, яке призводить до передачі водню з НАД-Н₂, на 3-фосфогліцерінову кислоту і відновленню її в молочну [31]:



Своє уявлення автори підтверджують тим, що додана в середовище піровиноградна кислота не відновлюється в молочну кислоту, а з неї утворюються ОС і С-з'єднання . За К. Нейбергом, останнім продуктом перед молочною кислотою є метилгліюксаль:



У розчині можуть відбуватися складні перетворення:

Гліцеринальдегід \longrightarrow Гліцерин- Гіпотетична Сз- сполука \longrightarrow Молочна кислота
 Піровиноградна кислота \longrightarrow Оцтова кислота + CO₂ + 2H. [32]

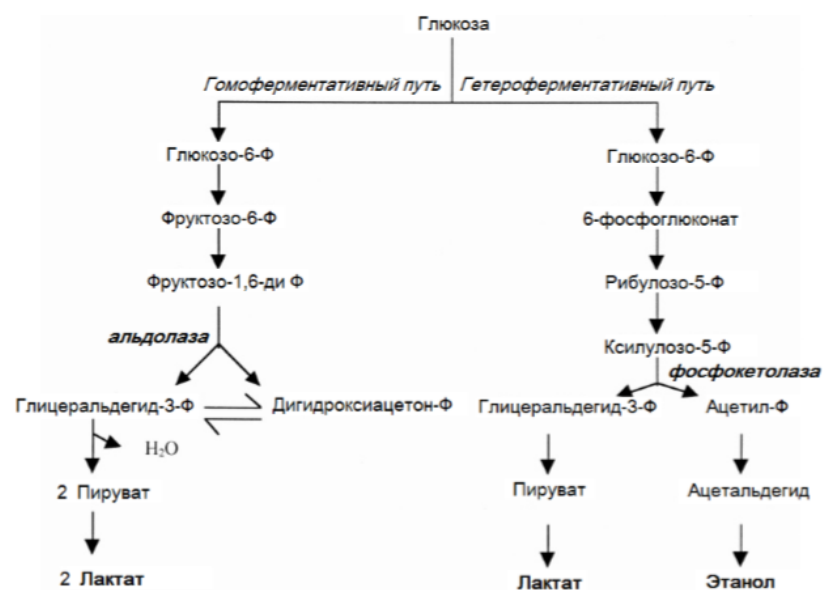
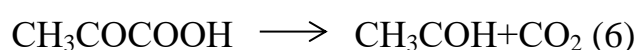
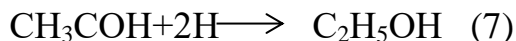


Рисунок 2.1. Схема гомо- та гетеро ферментативного бродіння

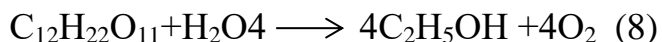
При змішаному молочно-спиртовому бродінні на лактозу діють ферменти молочних дріжджів і молочнокислих бактерій. Молочний цукор спочатку розчеплюється на галактозу та глюкозу, з подальшим перетворенням на піровиноградну кислоту. Частина піровиноградної кислоти відновлюється до молочної кислоти під дією ферментів молочнокислих мікроорганізмів. А інша частина піровиноградної кислоти під впливом ферменту карбоксилази , що міститься в клітинах молочних дріжджів, розчеплюється на оцтовий альдегід і вуглекислий газ[33]:



Оцтовий альдегід відновлюється до етанолу:



У загальному вигляді спиртове бродіння:



Під час молочнокислого та змішаного бродіння утворюється молочна кислота, що взаємодіє з казеїнаткальційфосфатним комплексом молока, відщепляє від нього кальцій та звільняє казеїн. Ця казеїнова кислота коагулює і утворює згусток[34].

У результаті біохімічних перетворень, що проходять при заквашуванні, кисломолочні продукти здобувають корисні властивості. Вони засвоюються краще, швидше та легше ніж звичайне молоко. Наприклад, якщо звичайне молоко засвоюється на 44% за 3 години, то кисляк на 95%. Це пояснюється зміною білків молока, які розкладаються на більш прості в результаті пентанізації. А також молочна кислота, вуглекислий газ, спирт, що утворюються в ході бродіння, впливають на секреторну діяльність шлунково-кишкового тракту. Також за рахунок виділення молочної кислоти в шлунку підвищується рН, що має антагонічну дію на хвороботворні бактерії. Також деякі кисломолочні бактерії здатні синтезувати вітаміни С та В₁₂[35].

2.3. Характеристика компонентного складу біотехнологічного препарату, отриманого в процесі реалізації технології

- Компонентний склад: *Streptococcus thermophilus*
Lactobacillus delbrueckii ssp. Bulgaricus.
- Мікробіологічна та хімічна чистота: Повинні бути відсутні бактерії групи кишкової палички при посіві 10 см³ закваски. Повинні бути відсутні інша стороння мікрофлора (спорові бактерії, дріжджі, цвілеві гриби).

Згідно з ДСТУ IDF 149 А: 2003 "Культури молочнокислих заквасок. Визначення видового складу", у рідких і сухих заквасках і

					ДП 6109. 00.000 ПЗ	Арк.
4						29
Зм.	Арк.	№	Підпис	Дата		

бактеріальних препаратах допускається вміст сторонньої незаквасочної мікрофлори.

Допустимий вміст заквасочних і сторонніх мікроорганізмів у заквашувальних препаратах :

1. Молочнокислі бактерії: 10^{11} КУО/г;
2. Немолочнокислі бактерії: < 50
3. Дріжджі та плісняві гриби: < 1
4. Коліформи: < 1
5. Ентерококи: < 10
6. *Staphylococcus aureus*: відсутні
7. Сальмонели: відсутні у 25г досліджуваного продукту
8. *Listeria monocytogenes*: відсутні у 25г досліджуваного продукту
- Вміст основної речовини та домішок: Вміст бактеріальних клітин має бути не менше ніж 10^{10} КУО. Без шкідливих домішок (антибіотиків). Можуть бути присутні домішки білка-казеїну.
- Наявність інших біологічно активних речовин: молочна кислота, амінокислоти і білки, вітамін К, пантотенову кислоту, вітаміни групи В: В1 - тіамін, В2 - рибофлавін, В3 - нікотинову кислоту, фолієву кислоту, В6 [36].

2.4. Методи очистки цільового продукту

Розрізняють такі способи концентрування та виділення продуктів:

- 1) Седиментація;
- 2) Фільтрування;
- 3) Центрифугування;
- 4) Сепарація;
- 5) Мембранні методи розподілу.

					ДП 6109. 00.000 ПЗ	Арк.
4						30
Зм.	Арк.	№	Підпис	Дата		

Седиментація- це процес розділення дисперсних систем під дією сили тяжіння і відділення згущеної дисперсної фази у вигляді осаду.

Цей метод використовують, коли: - діаметр частинок більше 3 мкм (броунівський рух не здійснює значного впливу на процес відстоювання); - необхідно розділити частинки на фракції по розміру та густині на основі різних швидкостей осадження; - Необхідно виділити стабільні продукти (фактор часу не має вирішального значення); - необхідно попередньо розділити суспензію на дві фракції: осад і надосадова рідина, які в подальшому можна обробляти на різноманітному обладнанні; - великі об'єми. Переваги методу: Це найбільш простий та дешевий процес.

Недоліки полягають у тому, що швидкість осадження біомаси та інших твердих частинок в КР мала і складає приблизно 10^{-6} - 10^{-7} м/с. Для пришвидшення процесу в КР додають коагулянти та флокулянти. Також відстоюванню підлягають не всі речовини, лише стабільні та частинки з діаметром більше 3 мкм [37]

Мембранні методи розділення, до них відносять діаліз, електродіаліз, оборотний осмос, ультрафільтрація та мікрофільтрація. Основним елементом апаратурного оформлення є напівпроникна мембрана.

Переваги методу:

1. Концентрування і очищення відбуваються без зміни агрегатного стану і фазових перетворень; - продукт не піддається тепловим і хімічним впливам; - механічна та гідродинамічна дія на біологічний матеріал незначна; - легко забезпечуються герметичність і асептичні умови на умови; - процес не володіє високою енергоємністю;
2. Основні обмеження у використанні пов'язані з тим, що деякі матеріали, з яких виготовляються мембрани, що не витримують дуже високих і дуже низьких значень рН або високих температур. Крім того, виникають труднощі при обробці розчинів, що містять тверду фазу. Однак ці труднощі успішно

					ДП 6109. 00.000 ПЗ	Арк.
4						31
Зм.	Арк.	№	Підпис	Дата		

3. долаються підбором нових видів матеріалів для виготовлення мембран і введенням стадії попередньої обробки [38].

Фільтрування- його основними перевагами є швидкість, кількість фільтрату.

Фільтрування – це гідродинамічний процес, швидкість якого прямо пропорційна різниці тисків, що створюються по обидва боки фільтрувальної перегородки, і обернено пропорційна опору руху рідини при її русі через пори перегородки і шар утвореного осаду

На процес фільтрування впливає ряд факторів:

- Макрофактори-поверхня фільтрації, різниця тисків, товщина шару осаду, в'язкість рідини. Ці фактори контролюються [39].

Центрифугування широко застосовується в мікробіологічних виробництвах насамперед для відділення біомаси з культуральної рідини (дріжджів, бактерій, грибів), відділення різних цільових продуктів мікробіологічного синтезу (антибіотиків, вітамінів ферментів і т. п.)

Центрифугування має і ряд суттєвих недоліків, які необхідно враховувати:

- Складність конструкції;
- висока вартість і енергоємність;
- складність експлуатації (ненадійність, вібрація, шум, необхідність періодичної розбирання і миття і т. п.).

Крім того, присутні недоліки, що мають значення саме для технології мікробіологічного синтезу: вплив на клітину відцентрової сили, нагрів, складність герметизації асептичних умов ведення процесу.

Однак головна перевага центрифугування - висока продуктивність та ефективність- дозволяє цьому методу успішно конкурувати з іншими способами виділення .

					ДП 6109. 00.000 ПЗ	Арк.
4						32
Зм.	Арк.	№	Підпис	Дата		

Тому, враховуючи все вище сказане як метод концентрування продукту, обираємо центрифугування [40].

2.5 Механізми впливу цільового продукту на біохімічні процеси

Займаючись проблемою довголіття, І.І. Мечников прийшов до переконання, що з передчасною старістю можна і потрібно боротися. Учений звернув увагу на те, що багато жителів Болгарії відрізняються великою тривалістю життя. На його думку, це довголіття обумовлено споживанням кисломолочного напою "кисело млеко" -болгарської кислого молока.

Корисні властивості заквасок:

- відновлює і підтримує здорову мікрофлору кишечника
- стимулює ріст і життєдіяльність власної мікрофлори (біфідо-і лактобактерій)
- сприяє зміцненню імунітету
- протистоїть кишкових інфекцій і гнильним бактеріям
- нормалізує травлення, покращує перистальтику, запобігає запори
- ефективний при місцевому застосуванні для боротьби з бактеріальними і грибковими ураженнями шкіри та слизових [41].

Лактобактерії мають ряд корисних властивостей:

- в процесі життєдіяльності вступають в складну взаємодію з іншими мікроорганізмами, в результаті чого придушуються гнильні і гноєтворні умовно патогенні мікроорганізми, в першу чергу протеї, а також збудники гострих кишкових інфекцій. В процесі нормального метаболізму вони здатні утворювати молочну кислоту, перекис водню, продукувати лізоцим, інші речовини з антибіотичною активністю: реутерін, плантаріцин, лактоцідін, лактолин;
- в шлунку і тонкій кишці лактобацили в кооперації з організмом господаря є основним мікробіологічними ланкою формування колонізаційної

					ДП 6109. 00.000 ПЗ	Арк.
4						33
Зм.	Арк.	№	Підпис	Дата		

- резистентності. Мають високу антагоністичну активність по відношенню до патогенних і умовно патогенних мікроорганізмів;
- Сприяють підвищенню імунітету. Змінюються показники клітинної ланки імунітету: за рахунок підвищення кількості CD4⁺ Т-лімфоцитів у селезінці зростала величина імунорегуляторного індексу CD4/CD8, згідно з яким оцінюють силу імунної відповіді, а також підвищувалась кількість активованих лейкоцитів, які експресували CD25⁺-антиген [42].

В даний час встановлено, що молочнокислі бактерії, утворюють антибіотики, які впливають на кишкову, паратифозну, тифозну, дизентерійну і туберкульозну палички, а також на гнильні мікроорганізми. Крім того, кисломолочні напої завдяки вмісту молочної кислоти і вуглекислого газу мають цілу низку чудових властивостей: вони збуджують апетит, вгамовують спрагу, підвищують виділення шлункового соку, посилюють перистальтику шлунково-кишкового тракту, покращують роботу нирок, передають людині всі харчові елементи молока, містять метіонін, холін, кальцій, мають антибіотичні властивості [43].

					ДП 6109. 00.000 ПЗ	Арк.
4						34
Зм.	Арк.	№	Підпис	Дата		

РОЗДІЛ 3. МЕТОДИ ОТРИМАННЯ ПРОМИСЛОВИХ ПРОДУЦЕНТІВ

3.1. Генетична вивченість продуцентів

Штами *L. delbrueckii* досить добре вивчені на сьогоднішній день. Дослідницькі роботи показали, що в лактобактерій є ген, що кодує EPS (для різного модулювання імунних реакцій). Послідовність цілого генома дозволила проаналізувати загальні ознаки генома *L. delbrueckii* TUA4408L, а також характеристики його генів EPS[44]. Типовий генний кластер EPS був виявлений у геномі TUA4408L, що складається з п'яти висококонсервованих генів *epsA* - *E*, та змінної області, що включає гени для полімерази *wzy*, *flippase wzx* та сім глікозилтрансферази. Крім того, ми тут вперше продемонстрували, що *L. delbrueckii* TUA4408L та його EPS здатні підвищити стійкість клітин P1E проти ротавірусної інфекції за рахунок зменшення вірусної реплікації та регуляції запальної реакції. Крім того, дослідження в клітинах P1E показали, що штам TUA4408L та його EPS диференціюють антивірусну вроджену імунну відповідь, ініційовану активацією Toll-подібного рецептора 3 (TLR3). *L. delbrueckii* TUA4408L та його EPS здатні посилити активацію сигнальних шляхів інтерферону регулятора (IRF) -3 та ядерного фактора κB (NF- κB), що призводить до вдосконаленої експресії антивірусних факторів інтерферону (IFN) - β , міксовірусу ген стійкості A (MxA) і RNaseL[45]

Також геном містить кілька генів, пов'язаних з перетворенням хітину, N-ацетилглюкозаміну, сахарози, мальтози, мальтодекстрину, манітолу та D-рибози. Крім того, в геномі виявлено гени для поглинання та утилізації трегалози, лактози та галактози, а також біосинтезу трегалози.

Streptococcus thermophilus ACA-DC 2 - це нещодавно секвенсований штам,

					ДП 6109. 00.000 ПЗ			
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата				
Розробила		Кічура М.А			РОЗДІЛ 3.Методи отримання промислових продуцентів	Стадія	Аркуш	Аркушів
Консульт.						Д	35	111
Керівник		Жолнер Л.Г				КПІ ім. Ігоря Сікорського		
Затвер.						ФБТ		

виділений з традиційного грецького йогурту. Серед 14 повністю секвенсованих штамів *S. thermophilus*, в даний час депонований у базі даних NCBI, штам ACA-DC 2 має найменшу хромосому, містить 1,731,838 п.е. Дослідження його геному виявила наявність 1850 генів, у тому числі 1556 генів, що кодують білки, 70 генів РНК та 224 потенційних псевдогенів. Ідентифіковано велику кількість псевдогенів. Це також супроводжувалося відсутністю патогенних ознак, що дозволяє припустити еволюцію штаму ACA-DC 2 через процеси розпаду геному, швидше за все, через адаптацію до молочної екосистеми. Аналіз показав існування одного повного оперона лактози-галактози, декількох протеолітичних ферментів, одного кластеру екзополісахаридів, генів стресової реакції та чотирьох можливих антимікробних пептидів.

3.1.1. Генетична карта продуценту

Загальні характеристики геному *L. delbrueckii* TUA4408L

Геном *L. delbrueckii* TUA4408L був зібраний в єдину кругову хромосому, що складається з 2012440 bp з вмістом 49,9% G + C (рис.). Секвенування геному також виявило, що штам TUA4408L - бактерія, що не містить плазміди. В цілому 2029 генів ,27 рРНК (включаючи 5S, 16S і 23S гени), 95 тРНК, 3 ncRNA і 222 псевдо генів були знайдені в круговій хромосомі штаму TUA4408L Рисунок 3.1[46].

В геномі *L. delbrueckii* TUA4408L було знайдено наявність двох неповних областей профага, розташованих у позиціях 136643–147495 (10,8 Kbp) та 474436–498733 (24,2 Kbp). Аналіз послідовності геному штаму TUA4408L показав наявність двох ORF, що кодують ентеролізін А, бактеріоцин. Гени стійкості до антибіотиків у штамі TUA4408L не були виявлені. Геном *L. delbrueckii* TUA4408L містить локуси CRISPR та білки Cas, які забезпечують специфічний для послідовності захист від чужорідної ДНК . У геномі TUA4408L знайдено область типу IC CRISPR – Cas, що складається з *cas3*,

					ДП 6109. 00.000 ПЗ	Арк.
4						36
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

cas5, cas8c, cas7, cas4, cas1, cas2 та масив CRISPR з 33 короткими прямими повторами[47].

L. delbrueckii TUA4408L має чудовий потенціал до метаболізму цукрів, оскільки його геном містить кілька генів, пов'язаних з перетворенням хітину, N-ацетилглюкозаміну, сахарози, мальтози, мальтодекстрину, манітолу та D-рибози. Крім того, в геномі виявлено гени для поглинання та утилізації трегалози, лактози та галактози, а також біосинтезу трегалози. *L. delbrueckii* TUA4408L має 338 унікальних генів, включаючи 136 білків з відомими функціями та 202 білки з гіпотетичними функціями[48].

Серед унікальних генів, присутніх у геномі *L. delbrueckii* TUA4408L, виявлено ген що кодує глікозилтрансферази, що беруть участь у біосинтезі EPS (обговорюється нижче). Крім того, в гені TUA4408L було виявлено кілька генів, що беруть участь у метаболізмі цукру. Система фосфоенолпіруват-залежної фосфотрансферази цукру (ПТС), основна система активного транспорту вуглеводів, каталізує фосфорилювання вхідних цукрових субстратів, що супроводжують їх переміщення по клітинній мембрані. У групі унікальних генів штаму TUA4408L було знайдено кілька генів PTS (включаючи ті, що беруть участь у транспортуванні глюкози (*crr3*), лактози (*lacF*), маннози (*manX, manZ*), целобіози (*celA, celD, bglK*) та маннобіози (*gmuC*), ліхенану (*licA, licC*), мальтози(*malP*), дисахарид хітину N, N' - діацетилхітобіози (*chbB*) та L-сорбози(*sorA,sorB*). Транспортери генів трегалози (*sugC*), рибози (*rbsB*) та L-арабінози (*araQ*), залучених до утилізації різних цукрів, включаючи *bglA*, який відіграє головну роль у використанні арбутину чи саліцину, та *levS*, який бере участь у обміні крохмалю та сахарози, а також гени, що беруть участь у біосинтезі глікогену (*glgA, glgB, glgC* та *glgD*), галактофуранозних глікокон'югатів (*glf*) та сахарози (*inuJ*), також були знайдені у групі унікальних генів TUA4408[49].

					ДП 6109. 00.000 ПЗ	Арк.
4						36
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

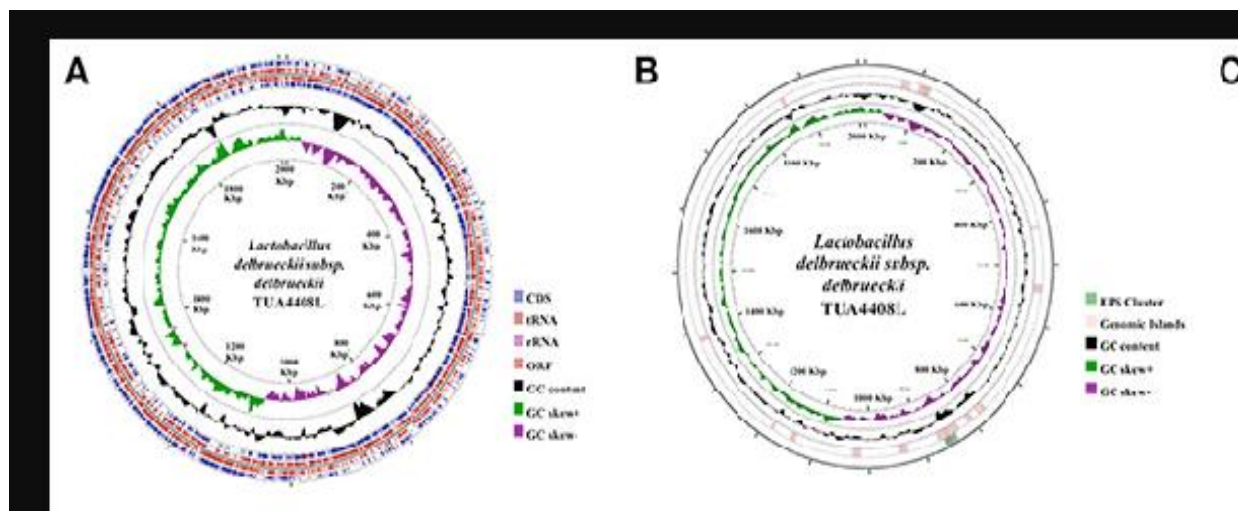


Рисунок 3.1. Генетична карта *L. delbrueckii* TUA4408L.

Характеристика EPS гена кластера *L. delbrueckii* TUA4408L

У LAB було описано, що типовий генний кластер EPS складається з п'яти висококонсервативних генів *epsA*, *epsB*, *epsC*, *epsD* і *epsE*, і змінної області, що включає гени для полімерази *wzy*, *flippase wzx* і а змінну кількість глікозилтрансфераз та інших ферментів, що модифікують полімер[50].

Функції продуктів гена EPS в *L. delbrueckii* TUA4408L можуть бути призначені за подібністю послідовностей: *epsA* був би позитивним регулятором оперона *eps*, *epsBCD* буде фосфорегуляторною системою, тоді як *epsE* буде фосфоглікозилтрансферазою, що ініціює біосинтез EPS. Полімераза *wzy* (*epsK*) і *flippase wzx* (*epsN*) також зустрічаються в кластері EPS *L. delbrueckii* TUA4408L[51].

У геномі TUA4408L знайдено гени, що кодують механізми збирання полісахаридів, включаючи ті, що беруть участь у ініціації біосинтезу EPS (*epsE*), експорті (*wzx/epsN*), приєднанні (*epsA*), полімеризації (*wzy/epsK*), а також модуль фосфорегуляції *epsBCD*. Крім того, в кластері EPS було виявлено з область, що містить гени для семи ймовірних глікозилтрансфераз (присутні сім генів, що кодують глікозилтрансферази, включаючи членів суперсімейства глікозилтрансфераз GTB, гліко-трансф-2-3, ферменту Caps-Shynth та Core-2)[van de Guchte M, Penaud S, Grimaldi C,

Barbe V, Bryson K, et al. The complete genome sequence of *Lactobacillus bulgaricus* reveals extensive and ongoing reductive evolution. Proc Natl Acad Sci U S A[52].

Більшість генів у кластері EPS *L. delbrueckii* TUA4408L щільно пов'язані (Рис.1Е); значні міжгенні пробіли існують лише між *gst3* та *gst4* (3,989 bp) та між *gst4* та *epsN* (5,754 bp). Однак передбачувані термінатори транскрипції або послідовності промотору консенсусу в цих прогалинах не виявлені Рисунок 3.2.

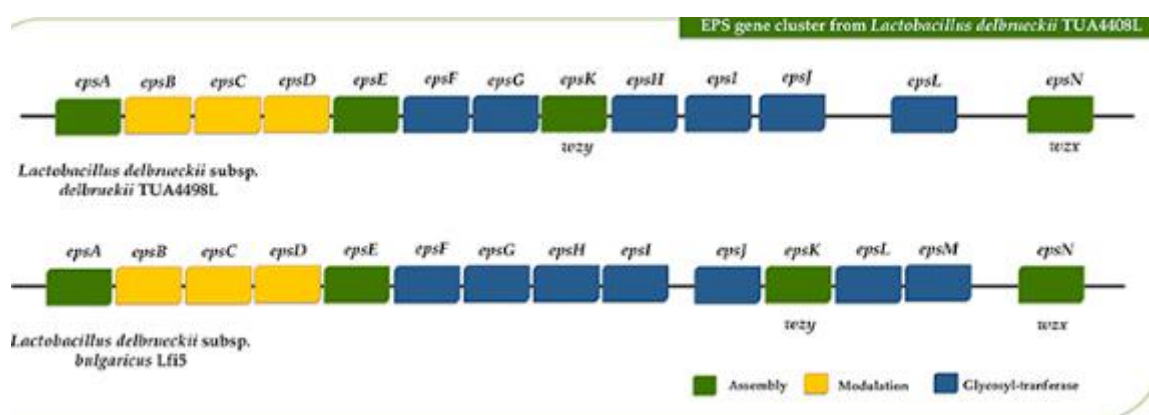


Рисунок 3.2. Схематична генетична організація кластеру генів екзополісахаридів (EPS) *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii*. Функціональне групування генів позначено різними кольорами.

Генетична карта *S. thermophilus* ACA-DC 2

Повний геном *S. thermophilus* ACA-DC 2 складається з однієї кругової хромосоми, що містить 1,731,838 п.н. Середній вміст ГХ в хромосомі становить 39,2%. Було знайдено 1850 генів, у тому числі 1556 генів, що кодують білки, 70 РНК (56 тРНК та 14 рРНК) та 224 потенційних псевдогенів. [53] Функціональні гени складають 1182 (63,89%), тоді як 1318 генів (71,24%) мали один або більше доменів Pfam .Аналіз показав, що приблизно 28,5% генів, що кодують білок, не мають жодної описаної функції. Більшість потенційних псевдогенів кодують гіпотетичні білки, транспозази та білки,

що беруть участь у транспорті та обміні вуглеводів. Високий відсоток псевдогенів разом із відсутністю типових факторів вірулентності для стрептококів свідчить про те, що штам ACA-DC 2 еволюціонував при розпаді геному під час адаптації до молочного середовища, багатого поживними речовинами Рисунок 3.3.

S. thermophilus ACA-DC 2 несе повний лактозо -галактозний оперон, що містить гени *galR*, *galK*, *galT*, *galE*, *galM*, *lacS* та *lacZ* (STACADC2_1195-1189), і він здатний ферментувати лактозу та галактозу, останню ферментує досить доволі повільно. Повідомлялося, що ферментація галактози обмежена серед штамів *S. thermophilus*. Як було сказано вище, кілька генів, відповідальних за транспорт і деградацію цукрів, такі як фруктоза, мальтоза та трегалоза, були ідентифіковані як псевдогени в геномі ACA-DC 2 [54].

Протеолітична система *S. thermophilus* ACA-DC 2 складається з кількох генів, що кодують амінопептидази, такі як *perA* (STACADC2_1626), *perC* (STACADC2_0202), *perF* (STACADC2_0406), *perM* (STACADC2_1333), *perN* (STACADC2_1332), *perN* (STACAD0_165), *perN* (STACAD0_165) *perP* (STACADC2_1520), *perQ* (STACADC2_0572), *perS* (STACADC2_0058), *perT* (STACADC2_0971), *perV* (STACADC2_0960) і *perX* (STACADC2_1446), один олігопептид *onp* транспортер ABC (STACADC2_1229-1233), чотири полярні амінокислотні транспортери ABC (STACADC2_0780-0782, STACADC2_0992-0995, STACADC2_1355-1358, STACADC2_1431-1433), два симпортери для амінокислот з розгалуженим ланцюгом (STACADC2_0872, глюкоза STACADC2_0872, STACADC2_0872, STACADC2_0872, глюкоза STACADC2_0872, транспортери (STACADC2_0547-0548, STACADC2_1281-1282). У штамі ACA-DC 2 бракує протеїнази, пов'язаної з клітинною стінкою (PrtS). Хоча цей ген може бути важливим для оптимального росту *S. thermophilus* у молоці, його відсутність має незначне значення при спільному культивуванні з протеолітичним *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, оскільки

					ДП 6109. 00.000 ПЗ	Арк.
4						36
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

[illegible]

					ДП 6109. 00.000 ПЗ	Арк.
4						37
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

(STACADC2_0849-0856), а інший - ні. Дві системи CRISPR-cas відрізнялися головним чином геном *csm* 6, який у випадку штаму ACA-DC 2 є потенційним псевдогеном. У поєднанні ці дані можуть свідчити про низьку активність або навіть інактивацію всієї системи CRISPR-cas у штамі ACA-DC 2. Інша можливість, яку не можна виключити, стосується низького впливу штаму ACA-DC 2 чужорідній ДНК. Звичайно, будь-який недолік у системі CRISPR-cas може бути компенсований системами модифікації обмежень (RM). Штам ACA-DC 2 несе чотири передбачувані системи RM, що належать до типів RM I (STACADC2_0642, STACADC2_0645, STACADC2_0648), II (STACADC2_0597-0598), III (STACADC2_07882689) та IV (STACADC2_07882689) [60].

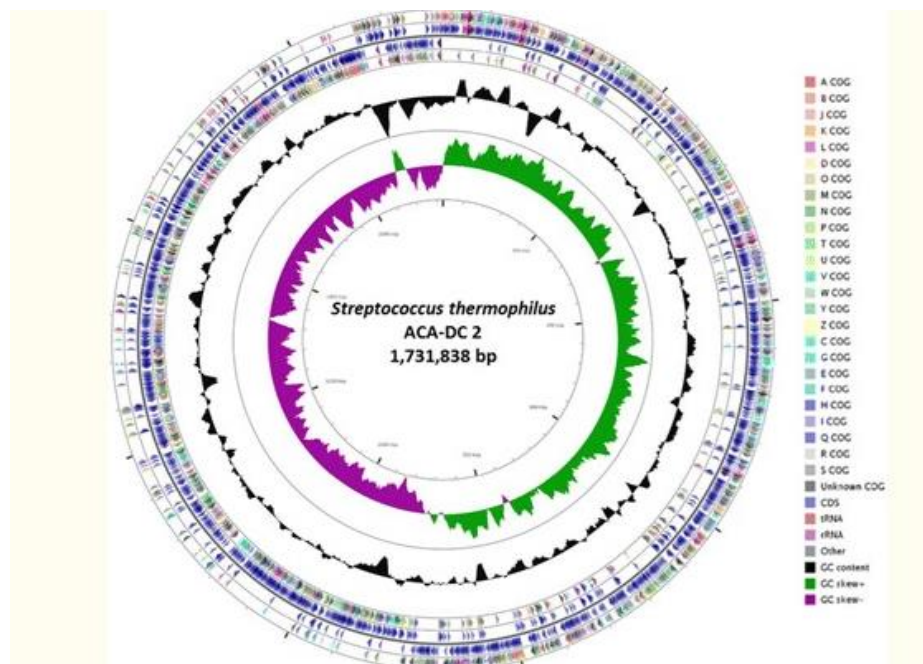


Рисунок 3.3. Генетична карта *S. thermophilus* ACA-DC 2

3.1.2. Механізми експресії генів, індукторів та репресорів процесу синтезу

L. delbrueckii subsp. bulgaricus

Після тиску для швидкого бродіння молока при виробництві йогуртів, *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* втрачає свою здатність регулювати експресію

					ДП 6109. 00.000 ПЗ	Арк.
4						38
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

оперона *lac*. Серія мутацій призвела до конститутивної експресії лак генів. А комплекс елементів послідовності вставки (IS) (ISL4 всередині ISL5), вставлених на межі промотору *lac*, індукувала втрату паліндромної структури одного з операторів, ймовірно залучених до зв'язування регуляторних чинників. Ген репресора *lac* був виявлений нижче гена -галактозидази *L. delbrueckii subsp. lactis* і було доказано, що він інактивується кількома мутаціями[61].

Також міститься лактозна пермеаза (*lacS*), що бере участь у поглинанні цукор і -галактозидаза (*lacZ*) для гідролізу лактози в глюкозу та галактозу. Наявність системи фосфоенолпірувату лактози фосфотрансферази з фосфо - галактозидазою, що регулює поглинання цукру та гідроліз, як це зустрічається у багатьох інших молочнокислих бактерій, не було виявлено у штамі *L. delbrueckii*. [62].

Регулювання експресії -галактозидази *L. delbrueckii subsp. bulgaricus*

Різні штами *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* та *L. delbrueckii subsp. lactis* вирощували в бульйоні MRS в присутності або лактози, або глюкози. Активність галактозидази спостерігалась у *L. delbrueckii subsp. Bulgaricus* у присутності лактози та глюкози що вказує на те, що регулювання експресії Лак гена була втрачена і галактозидаза продукується конститутивним шляхом, тоді як для *та L. delbrueckii subsp. lactis*. активність галактозидази була виявлена лише у присутності лактози, що свідчить про те, що продукція - галактозидази була пригнічена у відсутності лактози. Для того, щоб визначити функціональність ідентифікованого Лас репресора та його участь у регуляції гена *lac* , спонтанні конститутивні мутанти *L. delbrueckii subsp. lactis* LL44 обстежували на планшетах з агаром, що містять глюкозу та X-Gal. Одна колонія виявилася блакитною, що свідчить про вироблення галактозидази в присутності глюкози і тим самим конститутивної експресії Лас гену. Цей мутант (LL44 / 6), вирощували в бульйоні MRS вимірювали наявність глюкози, лактози або обох цукрів та активність -галактозидази –Галактозидаза.

					ДП 6109. 00.000 ПЗ	Арк.
4						39
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

Активність спостерігалася лише у присутності лактози для LL44, тоді як для мутанта LL44 / 6 і для N299, -галактозидази, активність реєстрували в присутності обох цукрів, що вказує, продукція -галактозидази вже не може бути пригнічена відсутністю лактози. Також результати підтвердили, що ізолюваний репресорний ген відповідає за регуляцію лак гена.

У *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* N299, наявні численні IS-елементи (IS, ISL3, розташований на 1,2 кб нижче від кінця гена lacZ) в промоторі lac та залишки гена-репресора по довжині гена lacZ, тому було виявлено генетичні нестабільності, в результаті чого відбуваються великі делеції. (4). Два гени, що кодують ферменти, що беруть участь у метаболізмі тРНК, аспарагіну тРНК-лігаза (asnS1) і аспартат-аміачна лігаза (asnA), були локалізовані безпосередньо після цього елемента IS. Поруч із цими генами РНК знаходиться ген, що кодує клітинну протеїнозу (prtB) (5), необхідну для перетворення казеїну молока.

Лас промотори були та ампліфіковані потім продукти ампліфікації клонували в pNZ272 (20) вспереду гена промотор-глюкуронідази (gusA).

Отримані в результаті плазмиди pLL110 і pLL113 (рис...) відповідно, були трансформовані у вільний плазмідний штам *Lactococcus lactis* MG1363. Трансформовані клітини вирощували в присутності різних цукрів та вимірювали активність -глюкуронідази. Результати показали, що lac промотори змогли індукувати вироблення глюкуронідази у *Lactococcus lactis*. Така ж активність спостерігалася і в присутності маннози та лактози для кожного промотору[63].

Ще одна цікава селективна перевага для більш високої експресії лакових генів у *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* - це скупчення мутацій у елементі, що реагує на метаболіти відповідає за неспецифічну регуляцію метаболіту вуглецю, індуковану фосфорильованим Нр-подібним комплексом СсрА (9). Промотор ефективно показав, що він не зазнає репресії катаболіту вуглецю в присутності глюкози, тоді як у тому обумовлює діяльність *L. delbrueckii subsp.*

					ДП 6109. 00.000 ПЗ	Арк.
4						40
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

промотор лактису був зменшений в 4 рази або 5 Рисунок 3.4 [64].

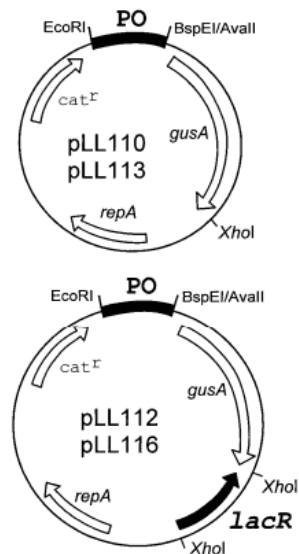


Рисунок 3.4. Фізична карта плазмід, що використовують для регуляції lac промоторів *L. delbrueckii*

Індукція генів *L. delbrueckii subsp. bulgaricus*

Експресія п'яти досліджених пептидаз була індукована у UKLc10 трансформувана плазмідною PusionA :: per Fusion та контролювана за допомогою SDS-PAGE з клітинними екстрактами.

Було виявлено, що інтенсивність пептидазних смуг зростала з часом індукції і залежала від використовуваної концентрації нізину. Всі з пептидази були чітко виявлені в екстрактах, приготованих 15хв після того, як було

додано 0,1 нг або 1 нг (рис. А) нізину на мл. Абсолютні кількості окремих пептидаз змінювалися в широких межах. PerG, PerI і PerW були сильно виражені у порівнянні з PerQ і PerL, які виявили лише крихітні смужки в гелі.

Екстракти клітин також використовувались для вимірювання конкретної активності пептидази за допомогою відповідних субстратів. Виявилося, що, активність усіх п'яти пептидаз виявляється через 15 хв після додавання нізину і збільшується час після індукції.

Що стосується *perL*, то зростання інгібувалося виробленням самої пептидази, що свідчить про високий рівень *PerL* може бути шкідливим для клітин Рисунок 3.5 [65].

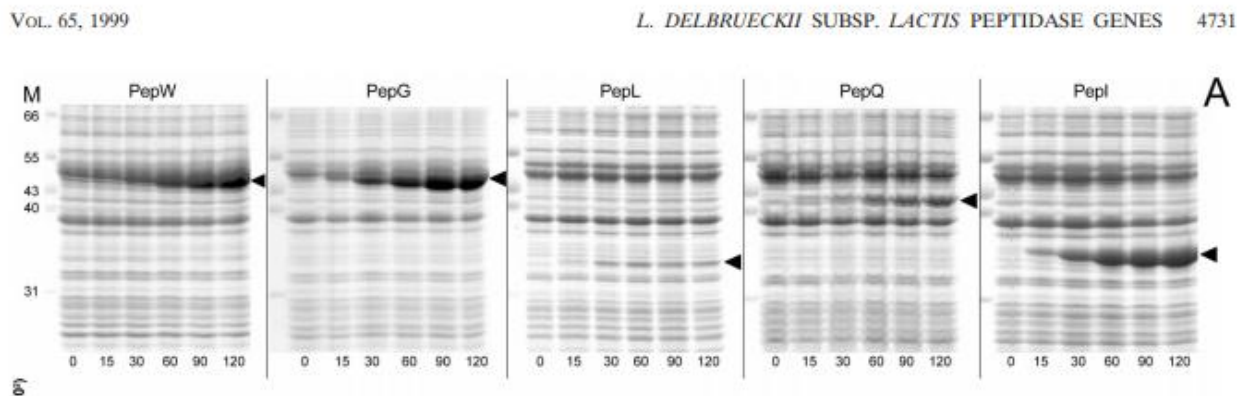


Рисунок 3.5 Хроматографія досліджуваних пептидаз

Експресія та регуляція інтегрованого гена *cat* у *Streptococcus thermophilus*

Плазміди *pGEM5* та *pUC19*, містять вибіркового маркера стійкості до еритроміцину. Інтегрована в хромосому *Streptococcus thermophilus* в локусах генів, що метаболізують лактозу. Інтеграція відбулася за допомогою гомологічної рекомбінації і призвела до коінтеграції плазміди та геному, з боку гомологічної ДНК, що використовується для інтеграції. Таким чином було інтегровано промотор-хлорамфенікол-ацетилтрансферазу (*cat*) ген між хромосомними генами *lacS* та *lacZ* лактози оперону. Вставлений ген *cat* як функціональна частина оперона і була відповідно регульована. Гени *lacS* та *lacZ* при нормальних умовах росту в молоці забезпечують підтримання та експресію цього інтегрованого гену. Оскільки є лише мінімальні повторювані послідовності ДНК (ділянка *NdeI*), які оточують вставлений ген *cat*, він стабільно регулюється навіть за відсутності лактози, тобто при вирощуванні на сахарозі або глюкозі [66].

Транспорт лактози (*lacS*)-лактозна пемеза, В-галактозидази (*lacZ*)-3-галактозидаза та хлорамфеніколу ацетилтрансферази (*cat*) ST11 та ST11-*cat*,

вирощений на лактозі, сахарозі галактозу . По мірі зростання бактерій на лактозі, активність гена оперона лактози була виражена. Те ж саме стосувалося росту клітин на сахарозі в присутності галактози, яка індукуює оперон, але не може ферментувати галактозу. Без галактози, спостерігається тільки слабка експресія генів. ST11, вирощений на лактозі, виявляє вищу активність Р-галактозидази, ніж клітини, вирощені на сахарозі з галактозою. Інтеграція *cat* гена в лактозний оперон не впливає на активність *lacS*, тоді як активність 3-галактозидази знижувалася приблизно до 10%. Подібні отримані результати для клітин, що вирощені на лактозі та сахарозі та галактозі. Це вказує на те, що транскрипція промотора істотно не впливає на інтеграцію *cat* гену в оперон. Активність хлорамфеніколу ацетилтрансферази ST11-Cat, вирощений на лактозі або на сахарозі та галактозі відповідна активність Р-галактозидази. Те саме було спостережено для клітин, вирощених на сахарозі без додавання галактози. Це вказує на те, що обидва гена експресуються і регулюються однаковою чином однаковими елементами генетичного контролю.

Отже, *lacS* та *lacZ* забезпечує регуляцію та експресію інтегрованого гена при зростанні клітини в їх природному середовищі існування[67].

3.2. Загальні методи створення високопродуктивних промислових продуцентів

Природні штами мікроорганізмів як правило низькопродуктивні. Тому в й промисловості застосовують селекційні методи: штучний та природний добір, гібридизацію. Методи клітинної та генної інженерії та методи індукованого мутагенезу не використовуються , оскільки за Законом України забороняється використовувати генетично модифіковані організми в харчових продуктах.

Для даної промисловості метод штучного добору забезпечує отримання найбільш ефективного промислового штаму *L. delbrueckii* TUA4408L та *S. thermophilus* ACA-DC 2. Схема отримання продуцента, що використовується в

					ДП 6109. 00.000 ПЗ	Арк.
4						43
Зм.	Арк.	№ док-м.	Підпис	Дата		

роботі включає наступні етапи: відбір зразків сирого молока для виділення культури молочнокислих бактерій, посів в стерильне молоко та інкубація до згортання молока; перевірка отриманого згустку на типовість органолептичних властивостей і мікрофлори; посів на щільне поживне середовище - агар з гідролізованим молоком; отримання моноколоній шляхом пересіву; вивчення цільових властивостей колоній; аналіз та відбір клітин з бажаними властивостями; стабілізація штаму; отримання промислового продуценту[68].

Відбір і підготовка молока

- Відбір і підготовку молока проводить лабораторія підприємства та особа, відповідальна за приготування виробничої закваски.
- При приготуванні виробничої закваски використовують незбиране або знежирене молоко.
- Відібране незбиране молоко очищають на сепараторах або фільтрують через фільтри, дозволені для фільтрації молока.
- Допускається використовувати молоко відновлене, що отримується з молока незбираного або знежиреного, свіже пастеризоване незбиране або знежирене молоко з кислотністю не більше 18°T з обов'язковою повторною його пастеризацією в.
- Пастеризацію, молока в заквасочник проводять при температурі $(95 \pm 2)^{\circ} \text{C}$ з витримкою (40 ± 5) хв. Під час витримки молоко має перемішуватися для рівномірного прогріву всієї маси. Після чого молоко охолоджують до температури сквашування.
- При необхідності приготування великої кількості закваски допускається її приготування в резервуарах місткістю до 6 т. У цьому випадку молоко, відібране для закваски, нагрівають в трубчастих пастерилізаторах до температури $(97 \pm 2)^{\circ} \text{C}$ і направляють в резервуар, де витримують протягом 40-60 хв при цій температурі.
- Молоко охолоджують до температури заквашування при перемішуванні в цих

					ДП 6109. 00.000 ПЗ	Арк.
4						44
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

- же резервуарах або шляхом циркуляції молока через резервуар і трубчастий охолоджувач або пластинчастий охолоджувач для кисломолочних продуктів[69].

Посів в стерильне молоко та інкубація до згортання молока

- Виробничу закваску готують з використанням лабораторної або пересадкової заквасок.
- Лабораторну та пересадочну закваску, приготовлену на стерилизованном молоці, вносять в охолоджене молоко в кількості (3-5)%.
- Після внесення закваски молоко ретельно перемішують і залишають при температурі сквашування до утворення згустку.
- У підготовлене та охолоджене до температури $(30 \pm 2)^\circ \text{C}$ молоко вносять з дотриманням правил асептики розчинений концентрат бактерій і ретельно перемішують після внесення 5-10 хв і два рази по 5 хв протягом 1 год. При температурі заквашування згусток утворюється через 14-16 год [70].

Посів на щільне поживне середовище - агар з гідролізованим молоком

Молочне поживне середовище для культивування лактобацил:

На 1000 мл дистильованої води (г):

- сухе знежирене молоко - 100
- натрій лимоннокислий -15
- глюкоза - 10
- агар -20

Сухе знежирене молоко містить: жирів - 1%, білків - 36%, лактози - 52%, мінеральних речовин - 6%. Казеїн молока утворює буферну систему. Для запобігання коагуляції казеїну в молочну основу вводять розчин натрію лимонкислого, який володіє сильними стабілізуючими і буферними

властивостями. Підвищенню ростових властивостей живильного середовища

					ДП 6109. 00.000 ПЗ	Арк.
4						45
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

сприяє вміст в ній лактози і глюкози [71].

3.2.1. Використання природного та штучного добору для отримання промислових продуцентів

Природний добір — метод в селекції, що передбачає виживання та переважне розмноження найбільш пристосованих до умов навколишнього середовища штамів. Шляхом природного добору сприятливі для виживання спадкові характеристики стають більш розповсюдженими в наступних поколіннях популяції, а несприятливі спадкові характеристик погано зникають. Це відбувається через те, що спадковість забезпечується генетичним апаратом, а мінливість забезпечується відмінностями між послідовностями алельних генів. Селекціонер намагається отримати таку форму мо, яка в деяких середовищах (несприятливих) є більш пристосованими ніж вихідний мікроорганізм. Перевага методу в тому , що все робить природа, мікроорганізм знаходиться в природних своїх умовах[72].

Недолік полягає в тому, що це довготривалий процес і це використання спонтанних мутацій, які не контролюються.

Використання штучного добору теж широко використовується. Штучний добір — це метод селекції, що передбачає створення селекціонером штучних умов існування. З подальшим відбором мікроорганізмів, що вижили. Далі вихідний штам тестують, висіваючи на 100 колоній і кожен колонію тестують на рівень синтезу. Якщо кожна колонія не відрізняється від усередненої колонії- то це генетичнооднорідна колонія і використовується штучний добір без мутагенного фактора[73].

У промислових процесах молочнокислі часто додають до молока у вигляді концентрованих заквасочних культур, які перебувають у замороженому або ліофілізованому вигляді. Такий спосіб має ряд переваг, таких як підвищення гнучкості в процесі бродіння та стандартизація біологічної активності.

					ДП 6109. 00.000 ПЗ	Арк.
4						46
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

Однак молочнокислі бактерії, часто мають слабку стійкість до заморожування або ліофілізації, що говорить про те, чому багато штамів не може бути легко вироблено в замороженому або ліофілізованому вигляді. Заморожування має кілька шкідливих впливів на клітини. Утворення кристалів льоду викликає механічні пошкодження мембран та інших клітинних компонентів. Кристалізація води також призводить до кріоконцентрації розчинних речовин, що викликає деяке осмотичне пошкодження, оксидативний стрес може виникати під час процедур заморожування-відтавання [74].

Під час виробництва заморожених концентрованих заквасочних культур кілька умов експлуатації мають великий вплив на стійкість молочнокислих бактерій до замерзання, і багато досліджень були присвячені оптимізації таких факторів, як склад культури середовище або додавання захисних засобів. Стійкість до замерзання також можна покращити, застосовуючи помірні стресові умови перед заморожуванням. Це пов'язано з фізіологічними змінами, такими як синтез специфічних білків стресу або модифікація жировокислотного складу мембрани.

Тому один з способів генерування штамів з поліпшеною кріотолерантністю відбір краще адаптованих генетичних варіантів шляхом природного відбору. Цього можна досягти шляхом виконання послідовних циклів культивування, які включають заморожування та відтавання культури. Теоретично, якщо з'являться краще адаптовані спонтанні мутанти, вони будуть прогресивно перевершувати початковий геноти[75]

Після 30 циклів субкультивування, заморожування та розморожування три культури містили субпопуляції з чіткими кріотолерантностями та закислювальною активністю. Це означає, що вони не склалися з одного єдиного генотипу, який раніше випереджав усі менш адаптовані генотипи. Пояснення цього різноманіття серед популяції є те, що генотипи, які

мають найбільшу кріотолерантність, не з'являлися досить довго, щоб перевершити всі інші генотипи. Це означає, що кріотолерантність трьох паралельних культур все-таки зростала б, якби експеримент проводився після 30 циклів субкультивування, заморожування та відтавання.

Кислотну активність заморожених культур молочнокислих бактерій можна поліпшити, застосовуючи високий тиск для відбору клітин із підвищеною швидкістю виживання до заморожування [76].

3.2.2 Використання гібридизації

Метод злиття протопластів

Для бактерій роду *Lactobacillus*, щоб отримати високопродуктивний штам використовують метод злиття протопластів. Такий метод має ряд переваг над іншими методами генетичного обміну:

- висока частота рекомбінантів, обмін великими ділянками ДНК
- однакова роль батьків у цьому процесі
- Ефективність методу: зливаються 10-50 % протопластів.

Щоб відбулося утворення рекомбінантних форм у результаті злиття протопластів, повинні відбутися такі процеси: цитоплазматична взаємодія, взаємодія ДНК-ДНК, регенерація клітинної стінки.

Недоліки методу:

- частина протопластів гине,
- зливаються більше двох протопластів, які є не життєздатними.

Таким чином було розроблено штам, шляхом переміщення геному штаму-мутанта *Lactobacillus delbrueckii* NCIM 2025 та амілази, що продукує *Bacillus amyloliquefaciens* ATCC 23842.

Вибраний гібрид міг безпосередньо використовувати скраплений крохмаль

марганцевого газу з мінімальними добавками поживних речовин для виробництва молочної кислоти. Вихід молочної кислоти 40 г / л та перетворений крохмаль в молочну кислоту на 96%. Також гібрид має високу толерантність до низького рН, кращу швидкість росту [77].

Метод трансформації

L. delbrueckii та *S. thermophilus* широко використовується в молочній промисловості як закваска. Незважаючи на важливість цих мікроорганізмів у харчовій промисловості, розуміння фізіології та генетики цих бактерій все ще обмежене. Цей факт частково можна пояснити відсутністю молекулярних інструментів, головним чином через відсутність надійної процедури трансформації.

У кількох дослідженнях описано введення ДНК в штами *L. delbrueckii* шляхом трансформації протопласту, трансплантації протопластів та електропорації [78]

Розробка процедур електропорації для декількох видів лактобактерій, зробили висновок про те, що кілька параметрів потрібно перевірити з метою оптимізації ефективності електропорації для цієї групи організмів. Серед цих параметрів є стадія росту, на якій збирають клітини, що залежить від виду або навіть штаму, що використовується; склад буферів для промивання та електропорації, який, як було показано, відіграє важливу роль у трансформації декількох лактобактерій; параметри електричного імпульсу; та джерело ДНК, що використовується для трансформації, оскільки системи модифікації обмеження можуть сильно інгібувати трансформацію з чужорідною ДНК [79]. Ще одна складність у розробці процедури трансформації - вибір використовуваної плазмиди. На жаль, встановлено, що *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* штами містять дуже мало плазмід.

Поки що три плазмиди з *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* виділені та принаймні частково секвенсовані. Однак механізми реплікації цих плазмід

					ДП 6109. 00.000 ПЗ	Арк.
4						49
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

не були визначені, і жодна з плазмід не мала гена стійкості до антибіотиків. Плазмиди, що походять від *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* - pBUL1, pN42.

Хоча було опубліковано декілька результатів про трансформацію *L. delbrueckii*, трансформативність цього виду ставилася під сумнів багато разів на основі численних невдалих спроб. Та все ж трансформація для цих бактерій можлива, яку можна використовувати щонайменше для трьох штамів *L. delbrueckii*, ATCC 11842, VI104 та CNRZ327

Реплікативні плазмиди, інтегративний вектор pMC1 та гени стійкості до антибіотиків служать надійною основою для розвитку генетичних та молекулярних досліджень *L. delbrueckii* [80].

Метод електропорації *Streptococcus thermophilus*

Електропорація - це застосування імпульсів електричного поля високої напруги для індукції перехідних пор в мембрані клітин, через які може відбуватися дифузія та обмін молекул.

Плазмиду pMK3, яка містить ген Lac Z, вводили в *Streptococcus thermophilus* шляхом електропорації. Плазмідна невелика (7,2 кб) і містить гени стійкості до ампіциліну та канаміцину та ген Lac Z. Клітини ранньої логарифмічної фази мали найбільшу трансформативність. Оптимальна напруженість електричного поля становила 6 кВ/см. Кількість трансформатів збільшувалась із концентрацією плазмідної ДНК. Галактозидазна активність *Streptococcus thermophilus* після електроінформації зросла в 7,5 разів.

Значне збільшення в Галактозидазної активності трансформованого *Streptococcus thermophilus* вказувала на експресію Lac Z [81].

3.2.3 Регуляція метаболізму

Регуляція засвоєння азотовмісних сполук

					ДП 6109. 00.000 ПЗ	Арк.
4						50
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

У всіх організмах нуклеотиди відіграють надзвичайно важливу роль; вони є субстратами для синтезу РНК та ДНК та є основними донорами енергії для клітинних процесів. У молоці пуринові нуклеотиди обмежують ріст для *S. thermophilus* але також шлях біосинтезу пурину є важливим для його оптимальності зростання (27). Було зазначено, що пуринові нуклеотиди синтезуються від PRPP (5-фосфорибозил-1-пірофосфату) до IMP за допомогою дев'яти різних ферментів; потім шлях розділяється на двоє, ведучи до АМР або GMP, завдяки двом ферментам для кожного з них. Також спостерігається зниження транскрипції у *prsA1* та *fhs* та в рівні білка Fhs, які необхідні для біосинтезу пурину для постачання PRPP і формільні групи відповідно. Ці результати показують, що під час зростання *S. thermophilus* у молоці, біосинтез пуринів було вимкнено на рівні транскрипції.

Однак добре встановлено, що для оптимального росту в молоці, необхідні добавки з пуринами . Тому при спільному вирощуванні *S. thermophilus* та *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* другий забезпечив пурини або їх попередники . Отже, всі ферменти, необхідні для біосинтезу пурину, присутні в геномі *L. Delbrueeki*.

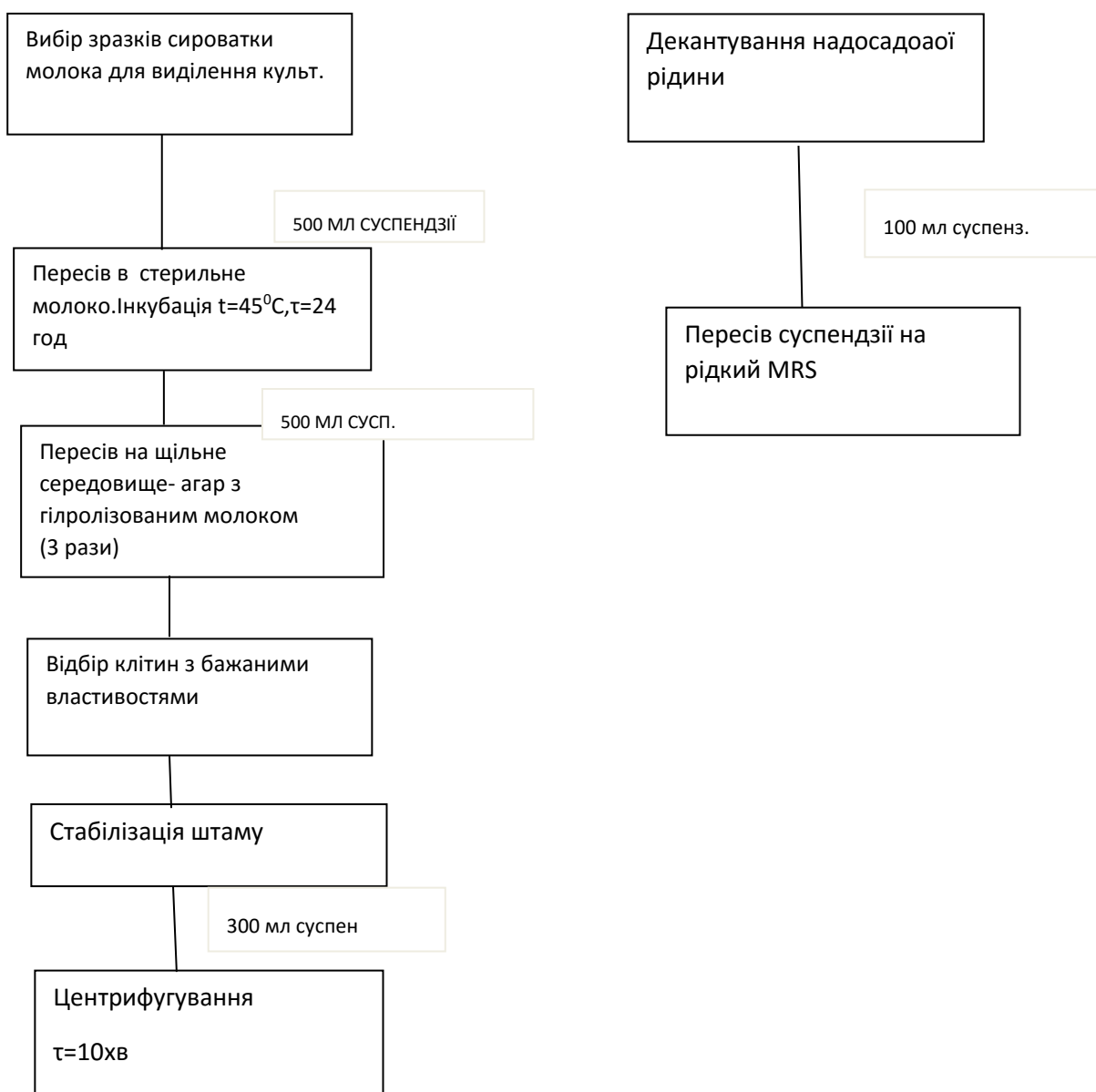
Докази:

- *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* має повний шлях біосинтезу пурину і росте в безпуриновому середовищі
- геном кодує передбачувані транспортери для пуринів або попередників
- урацилова пермеаза (*stu0336*) також чотири гени, що кодують фосфорибозил трансферази (Hpt, Apt, Xpt і HprT), що беруть участь у фосфорилуванні нуклеотидів. Це знизило PurM, PurH та Fhs (21), демонструючи, що екзогенні пурини інтерналізуються та знижують регуляцію відповідного шляху біосинтезу (4); спостерігалось надмірне вираження PurR та зменшення регуляції *prsA1* під час зростання *S. thermophilus*. Додавання пуринів у середовище призводить до інгібування PrsA1, синтази PRPP (6), що призводить

до зменшення внутрішньоклітинного PRPP пулу. Репресор PurR і призводить до репресії біосинтезу пурину[82] .

3.3. Схема отримання продуцента, що використовується в роботі

Штами *L. delbrueckii* TUA4408L та *S. thermophilus* ACA-DC 2 отримують з молока з подальшим проведенням відбору спонтанних мутацій. Відбір молочнокислих бакткрій відбувається по якості колоній та кількості продукування молочної кислоти, а отдже швидкості бродіння. Генетична стійкість досягається шляхом їх неодноразового пересіву на щільнесередовище, з подальшим пересівом на рідке MRS.



В результаті цього утворюється новий стійкий штам молочнокислих бактерій.

РОЗДІЛ 4. ТЕХНОЛОГІЧНА ЧАСТИНА

4.1. Характеристика кінцевої продукції виробництва

1. Назва продукції :

Концентрат закваски бактеріальної для виробництва йогурту на основі *S. thermophilus* та *L. delbrueckii*

2. Категорія та номер діючого нормативно-технічного документу на продукцію та реєстраційний номер:

ГОСТ 34372-2017 Закваски бактериальные для производства молочной продукции. Общие технические условия.

3. Призначення продукції та можливі галузі використання:

Бактеріальна закваска для виготовлення кисломолочної продукції.

4. Стислий опис зовнішнього вигляду та фізико-хімічних характеристик продукції:

Продукція, що запланована до випуску має зовнішній вигляд однорідного прошку, що має колір від світло-кремового до світло-коричневого або колір наповнювача;

Склад мікрофлори повинен відповідати вимогам документів, за якими виготовляється молочна продукція із застосуванням певних бактеріальних концентратів.

5. Нормативні вимоги до упаковки, маркування, транспортування, зберігання та терміну придатності продукції:

					ДП 6109. 00.000 ПЗ		
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата			
Розробила	Кічура М.А				РОЗДІЛ 4. Технологічна частина	Стадія	Аркуш
Консульт.						Д	53
Керівник	Жолнер Л.Г					КПІ ім. Ізгоря Сікорського	
Затвер. 4						ФБТ	
						Аркушів	111

Маркування

Інформацію, що відповідає вимогам Технічного регламенту Митного союзу "Про безпечність молока та молочної продукції", наносять на пакувальну одиницю з бактеріальною закваскою (БЗ) або бактеріальним концентратом (БК) за допомогою етикетки або вказують безпосередньо на пакувальному матеріалі або в товаросупровідних документах.

Дату виготовлення наносять будь-яким способом, що забезпечує її чітке прочитання.

Кожна пакувальна одиниця повинна містити наступну додаткову інформацію:

- склад мікрофлори, представлений шляхом перерахування видових назв культур, що входять в бактеріальних заквасках або концентратах і / або бактеріальну формулу, представлену аналогічним способом;
- кількість одиниць активності БЗ або БК або кількість мікроорганізмів, виражене в КУО / г (смГОСТ 34372-2017 Закваски бактеріальні для виробництва молочної продукції. Загальні технічні умови), при вказівці маси нетто або об'єму БЗ або БК в одиниці упаковки;
- номер партії БЗ або БК.

Упаковка

1. Пакувальні матеріали та транспортна упаковка повинні відповідати вимогам Технічного регламенту Митного союзу "Про безпечність молока та молочної продукції" і документів, відповідно до якого вони виготовлені та Технічного регламенту Митного союзу "Про харчову продукцію в області її маркування"; забезпечувати збереження якості і безпеки БЗ при їх перевезеннях, зберіганні та реалізації.

2. БЗ або БК повинні бути розфасовані в умовах, що забезпечують запобігання потрапляння сторонніх мікроорганізмів, в ємності, наприклад флакони, або

					ДП 6109. 00.000 ПЗ	Арк.
4						54
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

пакети з вологонепроникного комбінованого матеріалу або полімерної плівки, дозволених до використання в якості пакувального матеріалу для харчових продуктів.

3. Розфасовані БК укладають в транспортну упаковку – в спеціальні холодильники де підтримується температура $+2-+8^{\circ}\text{C}$, з дотриманням заходів, що виключають можливість пошкодження під час перевезення або пересилання.

4. У ящики поміщають БК згідно з товаросупровідними документами.

5. Допускається використання інших пакувальних матеріалів і транспортної упаковки, дозволених для контакту з харчовими продуктами, що забезпечують збереження якості і безпеки БЗ при їх перевезеннях, зберіганні та реалізації

Транспортування та зберігання

1. БК перевозять в транспортних засобах відповідно до правил перевезення вантажів, що діють на транспорті відповідного виду, або поштовими посилками, або бандеролями відповідно до вимог поштових правил, затверджених на території держави, яка прийняла цей Стандарт. Закваски повинні транспортуватися в холодильних камерах за температури $+2-+8^{\circ}\text{C}$

2. Терміни придатності та умови зберігання встановлює виробник заквасок у відповідних документах на конкретні БЗ і БК. У холодильнику (при температурі $+2 \dots +8^{\circ}\text{C}$) - 12 місяців.

4.2. Характеристика сировини, матеріалів та напівпродуктів, що використовуються у виробництві

Для отримання інокулята *S. thermophilus* та *L. delbrueckii subsp. Bulgaricus* використовується середовище MRS. Склад MRS Агару г / л: Екстракт з м'яса, дріжджовий екстракт, цитрат амонію, ацетат натрію, глюкоза, сульфат магнію, сульфат марганцю, дигідрофосфат калію, агар-агар. Для культивування *S. thermophilus* та *L. delbrueckii* використовується молоко.

					ДП 6109. 00.000 ПЗ	Арк.
4						55
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

Таблиця 4.1. Характеристика сировини, матеріалів та напівпродуктів

Найменування	Категорія і номер НТД, згідно якої перевіряються показники якості	Показники, що обов'язкові для перевірки та їх нормативне значення	Примітка
1	2	3	4
1.Основна сировина:			
1.1.Агар-агар	ГОСТ 16280-2002 Агар пищевой Технические условия	Зовнішній вигляд Колір Запах Смак Наявність домішок	Крупинки,пластинки,порошок Кремовий, бежевий Без сторонніх запахів Без сторонніх присмаків Недопускається
1.2.Ацетат натрію	ГОСТ Р 54626-2011. Добавки пищевые. Натрия ацетаты Е262. Общие технические условия	Зовнішній вигляд Запах	Білий кристалічний порошок або гранули Без запаху, або запах оцтової кислоти
1.3. Вода питна	Технічні умови» та ДСТУ 7525:2014 «Вода питна. Вимоги та методи контролювання якості»	Запах, Смак, мікробіологічна чистота	Відповідає вимогам
1.4.Глюкоза	ГОСТ 975-88 Глюкоза кристаллическая гидратная. Технические условия	Зовнішній вигляд Смак, Запах Колірність розчину в одиницях оптичної густини, не більше Прозорість розчину, світлопропускання, %, не більше	Білий кристалічний порошок Властивий глюкозі, без стороннього запаху 0,1 80

Продовження Таблиці 4.1

1	2	3	4
		<p>Масова доля вологи, %, не більше</p> <p>Питоме обертання, град.</p> <p>Масова доля золи в перерахунку на суху речовину, %, не більше</p> <p>Масова доля заліза в перерахунку на суху речовину, %, не більше</p> <p>Присутність вільних мінеральних кислот</p>	<p>9</p> <p>52,5-53</p> <p>0,07</p> <p>0,003</p> <p>Не допускається</p>
1.5.Дигідрофосфат калію	ГОСТ 4198-75 Реактивы Калий фосфорнокислый однозамещенный Технические условия	<p>Масова частка однозамещенного фосфорнокислого калію</p> <p>Масова частка не розчинні у воді речовин, %, не більше</p> <p>Масова частка втрат при висушуванні, %, не більше</p> <p>Масова частка загального азоту (N), %, не більше</p> <p>частка сульфатів</p> <p>Масова частка хлоридів (Cl), %, не більше</p> <p>Масова частка заліза (Fe), %, не більше</p>	<p>99,5</p> <p>0,002</p> <p>0,2</p> <p>0,001</p> <p>0,002</p> <p>0,0005</p> <p>0,001</p>

Продовження Таблиці 4.1

1	2	3	4
		<p>Масова частка важких металів (Pb),%, не більше</p> <p>Масова частка миш'яку (As),%, не більше</p> <p>Масова частка натрію (Na),%, не більше</p> <p>Масова частка кальцію (Ca),%, не більше</p> <p>pH розчину препарату з масовою часткою 5%</p>	<p>0,0005</p> <p>0,0001</p> <p>0,05</p> <p>0,05</p> <p>4,4-4,7</p>
1.6.Дріжджовий екстракт	ТУ 9385-007-39484474-2003 Дрожжевой экстракт сухой	Кількість мезофільних аеробних і факультативно анаеробних мікроорганізмів в 1 г, КУО, не більше	$1 \cdot 10^3$
1.7.Екстракт з м'яса	ГОСТ 7269-79	Зовнішній вигляд Колір Запах	Рідина Жовтий Характерний
1.8.Казеїн	ГОСТ 31689-2012 Казеин. Технические условия	Зовнішній вигляд Колір Чистота	Сипучий порошок Жовтий Не нижче групи 2
1.9.Молоко	ГОСТ 31450-2013 Молоко питьевое. Технические условия	Зовнішній вигляд Запах і смак Консистенція Колір	Непрозора рідина Характерний для молока Рідка, однорідна Білий

1	2	3	4
1.10.Сульфат магнію	Гост 9097-82 Межгосударственный стандарт Сульфат аммония Технические условия	Зовнішній вигляд Масова частка азоту в перерахунку на суху речовину,%, не менше Масова частка води,%, не більше Масова частка вільної сірчаної кислоти,%, не більше Фракційний склад: Розсипчастість,% Масова частка нерозчинного у воді залишку,%, не більше	Білі або прозорі кристали 21 0,2 0,03 масова частка фракції розміром більше 0,5 мм,%, не менше 80 менше 6 мм,% 100 0,02
1.11.Сульфат марганцю	ГОСТ 435-77	Масова частка сірчаноокислого марганцю Масова частка нерозчинних у воді речовин,%, не більше Масова частка хлоридів (Cl),%, не більше Масова частка заліза (Fe),%, не більше Масова частка кальцію і натрію (Ca + Na) в сумі,%, не більше	98,0 0,003 0,001 0,0005 0,03

Продовження Таблиці 4.1

1	2	3	4
		Масова частка важких металів (Pb),%, не більше Масова частка цинку (Zn),%, не більше	0,0002 0,005
1.11.Цитрат амонію	ГОСТ EN 15957-2012	Зовнішній вигляд	Білий порошок
1.12Біомаса бактерій	ГОСТ 34372-2017 Закваски бактериальн ые для производства молочной продукции. Общие технические условия	Життєздатність Кількість КУО Бродильна здатність	Життєздатні 10 ⁷ КУО/г
2.Допоміжні речовини			
2.1 Вода питна	Технічні умови» та ДСТУ 7525:2014 «Вода питна. Вимоги та методи контролювання якості»	Запах, смак, мікробіологічна чистота	Відповідає вимогам
2.2Розчин натрію гідроксиду 1%	ГОСТ 2263-79 Натр їдкий технічний. Технічні умови	Зовнішній вигляд Масова частка гідроксиду натрію,%, не менше	маса білого кольору. Допускається слабка забарвлення 98,5

1	2	3	4
		Масова частка вуглекислого натрію,%, не більше	0,8
		Масова частка хлористого натрію,%, не більше	0,05
		Масова частка заліза в перерахунку на Fe ₂ O ₃ ,%, не більше	0,004
		Сума масових часток оксидів заліза, алюмінію,%, не більше	0,02
		Масова частка кремнієвої кислоти в перерахунку на SiO ₂ ,%, не більше	0,02
		Масова частка сульфату натрію,%, не більше	0,03
		Сума масових часток кальцію і магнію в перерахунку на Ca,%, не більше	0,02
2.3 Хлорне вапно 2%	ГОСТ 1692-85 Известь хлорная. Технические условия	Зовнішній вигляд	Порошок білого кольору
		Масова частка активного Хлору	28
		Коефіцієнт термостабільності	0,90
3. Матеріали			
3.1 Упаковка: Пластикові баночки з корками	ГОСТ 17527-2014 (ISO 21067:2007) Упаковка. определения	Цілісність	Цілісні

1	2	3	4
4.Напівпроду кти			
4.1 закваска рідка	ГОСТ 34372-2017 Закваски бактериальные для производства молочной продукции. Общие технические условия.	Зовнішній вигляд Компонентний склад Колір	Однорідна рідина <i>S. thermophilus</i> та <i>L. delbrueckii subsp. Bulgaricus</i> Однорідний білий

4.3. Опис технологічного процесу

Одержання концентрованих заквасок для ферментованих молочних продуктів проводять такі технологічні операції:

ДР 1 Санітарна підготовка виробництва.

ДР 1.1 Підготовка персоналу. При влаштуванні на роботу та щорічно персонал, який безпосередньо задіяний у виробництві препаратів, повинен пройти медичний огляд, пройти систематичне навчання щодо санітарно-гігієнічних вимог, а також дотримуватися правил особистої гігієни. Кожен працівник виробничого цеху повинен бути забезпечений 4 комплектами санітарного одягу, заміна одягу відбувається у міру забруднення. Працівники перед початком роботи повинні одягти чистий санітарний одяг, підібрати волосся під хустинку або ковпак, зняти з себе прикраси, змити лак з нігтів, ретельно вимити руки теплою водою з милом і продезінфікувати їх.

Робочий одяг одержують з пральні випраним, продезінфікованим та запакованим у стерильні пакети [83].

ДР 1.2 Підготовка дезінфікуючих, миючих та робочих розчинів. Підготовка NaOH та Хлорного вапна в концентрації 1-2%.

Всі мийні, дезінфікуючі розчини готує блок стерилізації. В реактори через дозатор, який встановлено на трубопроводі, надходить потрібна кількість

дезінфекційного або миючого розчину (каустична сода) та змішується з водою, яка дозується через датчик об'єму. Після 10хв перемішування отримуємо розчини для миття і дезінфекції обладнання та комунікацій.

Для миття та дезінфекції обладнання використовується 2% розчин каустичної соди. Для прикотування 1 л розчину беруть приблизно 20г сухої каустичної соди і додають близько 980мл води. Приготований розчин зберігають у герметично закритому скляному посуді в прохолодному місці.

ДР 1.3 Підготовка виробничих приміщень. Включає щоденне прибирання та генеральне прибирання. Генеральне прибирання виробничих приміщень проводять один раз на 6 діб. Прибирають стелі, підлоги, стіни, підвіконня, поверхні всього обладнання, комунікації, меблі.

ДР 1.4 Підготовка обладнання та комунікацій. Мийка обладнання та комунікацій. Перевірка на герметичність. Р-0.2 МПа, τ -30хв. Стерилізація обладнання та комунікацій. При очищенні технологічного обладнання, використовують засоби розчин етилового спирту 3%, 6% та інвентар призначені виключно для цих цілей.

Спочатку обладнання миють. Через технологічне обладнання пропускають миючий засіб. Обробку ферментера проводять після кожного культивування 2 % розчином каустичної соди упродовж 15 хв. Далі ополіскування. Ополіскування продовжується очищеною водою.

Перевірку обладнання на герметичність проводять після проведення всіх ремонтних та перевірочних робіт. Ємкісне обладнання на герметичність перевіряють при повітряному тиску 0,5 – 0,6 МПа. Якщо упродовж 30 хв тиск (за манометром) не знижується, обладнання вважають герметичним. Фланцеві з'єднання та зварні шви перевіряють на герметичність за допомогою мильної води при повітряному тиску від 0,5 до 0,6 МПа. Остаточний етап - стерилізація обладнання. Стерилізацію ферментеру проводять шляхом подання гострої пари при тиску 0,2МПа, тривалість 90хв, температура 110°C.

					ДП 6109. 00.000 ПЗ	Арк.
4						63
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

ДР 2. Підготовка повітря

ДР 2.1 Забір атмосферного повітря та механічна очистка.

Атмосферне повітря забирають через забірну шахту на висоті 30 м. Повітря, що використовується для аерації не повинно мати механічних домішок, бути стерильним та мати певну температуру від 45-60°C.

Очистку повітря здійснюють у чарунковому фільтрі. При проходженні повітря через фільтр грубого очищення, пил та механічні частки з повітря осідають, а очищене повітря надходить у компресор. Ступінь очищення становить 80 %.

ДР 2.2 Видалення вологи та стабілізація термодинамічних показників

Для підтримки температури повітря 18-26 °C, що нагнітається вентилятором та пропускають через калорифер зимою в калорифери надходить пара. Улітку калорифери відключаються, а холодна вода подається безпосередньо в камеру зрошення за допомогою насоса.

При цьому вологість повітря становить W-65%. Після чого охолоджене повітря надходить до теплообмінника та на парозволожувач для регулювання термодинамічних показників повітря, температура 15°C.

При стисканні повітря у компресорі його температура підвищується з 15-25°C на вході в повітродувку до 90 °C на виході з неї. Перед подачею в головний фільтр повітря охолоджують.

Після компресора повітря має наступні характеристики температура 30 °C, вологість - 60 %.

ДР 2.3 Очистка на головному фільтрі.

Охолоджене повітря, проходячи крізь шар базальтового волокна, очищається від пилу та мікроорганізмів. Ступінь очищення становить ефективність 99,5%, діаметр пор-1,5 мкм.

ДР 3. Підготовка упаковки.

					ДП 6109. 00.000 ПЗ	Арк.
4						64
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

Зі складу надходять вже стерильні пластикові баночки і корки. Їх перевіряють на мікробіологічну чистоту[84].

ДР 4 Приготування та стерилізація поживного середовища.

Приготування та стерилізація поживного середовища MRS для інокуляції відбувається роздільно в апаратах УНС -5.

ДР 4.1 Підготовка та стерилізація термолабільних речовин.

Приготування розчину агару-0.12кг, дріжджового екстракту-0.5кг та м'ясного екстракту -0.8кг відбувається в реакторі УНС-5, його гомогенізація відбувається при частоті мішалки 90 об/хв, рН розчину відповідає 5-6, концентрація сухих речовин 8%. Стерилізація розчину відбувається насиченою парою при температурі 125⁰С, тиску 0,1МПа, протягом 10-15хв. Далі проводять охолодження розчину до температури 45-47⁰С, тиску 0,1МПа, протягом 10-15хв [85].

ДР 4.2Підготовка та стерилізація термостабільних речовин

Приготування сольового розчину (цитрат амонію-0.02кг, ацетат натрію-0.05кг, глюкоза-0.2кг, сульфат магнію-0.0005кг, сульфат марганцю-0.0002кг, дигідрофосфат калію- 0.02кг) відбувається в реакторі та гомогенізація при оберті мішалки 90 об/хв, концентрація дорівнює 50%,рН розчину 6,5-8,5, t-50⁰С, тиск 0,6МПа. Далі відбувається стерилізація насиченою парою: при температурі 125⁰С, тиску 0,1МПа. Охолоджують розчин солей до температури 45-47⁰С, за тиску 0,1Мпа, протягом10-15хв.

ДР 4. Підготовка захисного середовища.

Казеїн зі складу розводять з питною водою до концентрації 9%. Стерилізація відбувається в автоклаві при температурі 125⁰С, за тискуу 0,1МПа, протягом10-15хв. Далі розчин охолоджують до 5 ⁰С, протягом 10-15хв [86].

ДР 6 Приготування посівного матеріалу .

					ДП 6109. 00.000 ПЗ	Арк.
4						65
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

Розмножені в лабораторії культури *S. thermophilus* та *L. delbrueckii subsp. Bulgaricus*, які вирощували спочатку окремо, а потім разом на середовищі MRS в колбах, додають в інокулятор місткістю 15л в рідке поживне середовище MRS. Вирощування культури відбувається за температури 45°C, та тиску 0,1МПа, протягом 24год.

ТП 7 Приготування закваски

ТП 7.1 Підготовка та кип'ятіння молока.

Спочатку молоко знежирюють шляхом центрифугування до концентрації сухих речовин 9-12%, відсоток жирності відповідає 2,5%. Далі молоко кип'ятять і витримують при температурі 90-95°C протягом 30-45 хв. Охолодження підготовленого молока відбувається до температури культивування 42-45°C протягом 10-15 хв.

ТП 7.2 Виробниче культивування закваски.

В охолоджене молоко до температури 42-45°C, додають бактеріальний інокулят *S. thermophilus* та *L. delbrueckii subsp. Bulgaricus*. Кількість бактерій, що вноситься в молоко дорівнює 2,5-3%. Основний біосинтез здійснюють у ферментері на підготовленому молоці за таких параметрів культивування: рН-5,0-4,2; при температурі 45°C; протягом 7-8год ;за надлишкового тиску 0,03 – 0,04 МПа. Упродовж процесу біосинтезу періодично, кожні півгодини на 10 хв вмикають перемішувальний пристрій, а також це роблять через кожні 2 год культивування. Процес культивування зупиняють після досягнення концентрації бактерій на рівні 10^9 КУО/см³.

ТП 7.3 Охолодження закваски.

Після того, коли було досягнено концентрацію бактерій на рівні 10^{11} КУО/см³, відбувається охолодження закваски до температури 5°C, протягом 10-15 хв. для того щоб зупинити розмноження та розвиток бактерій.

ТП 8 Концентрування закваски шляхом центрифугування .

					ДП 6109. 00.000 ПЗ	Арк.
4						66
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

Після того як було завершено основний біосинтез, охолоджена закваска потрапляє до центрифуги де досягається концентрація бактерій на рівні 10^{11} КУО/см³. Центрифугування відбувається протягом 10 хвилин , при швидкості обертів 6000об/хв [87].

ТП 9 Змішування закваски з захисним середовищем

Бактеріальну масу термофільних молочнокислих бактерій змішують з 9-10% розчином казеїну, який слугує захисним середовищем бактеріальних клітин.

ТП 10 Ліофільне висушування бактеріального концентрату.

Процес ліофільного сушіння проводять в глибокому вакуумі в стерильних умовах в спеціальних кюветах. Закваска на початкових стадіях сушки віддає частину вологи, охолоджується і заморожується рівномірним шаром при

температурі $-38^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$, тривалість 12 год. Потім у сушарку подається тепло і лід сублімує. Тривалість висушування в середньому складає 8 год при температурі, $t=+30^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$. Залишкова вологість ліофілізованого препарату - 2%.

ТП 11 Гомогенізація препарату.

Після сушки об'єкт вивантажують в асептичних умовах і розпушують до розміру часток $D=0,09-0,095\text{мм}$. в гомогенізаторі.

ПМВ 12 Фасування та пакування.

Фасують та упаковують сухий продукт в стерильні пластмасові баночки по 100г, потім закривають пласмасовими корками[88]

					ДП 6109. 00.000 ПЗ	Арк.
4						67
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

4.4. Матеріальний баланс

Таблиця 4.2. Матеріальний баланс виробництва

Використано				Отримано			
Назва сировини, матеріалів та напівпродуктів	Кількість			Назва кінцевого продукту або напівпродукту, відходів та втрат	Кількість		
	кг	л	шт		кг	л	шт
ДР 1 Санітарна підготовка виробництва							
Кальцію гіпохлорит	1			Хлорне вапно 2%		50	
Вода питна		49					
Всього	50			Всього	50		
Натрію гідроксид	0,5			Розчин натрію гідроксиду 1%		50	
Вода питна		49,5					
Всього	50			Всього	50		
ДР 2 Підготовка вентиляційного повітря							
Повітря з атмосфери	1100			Очищене повітря	1000		
Фільтрувальний матеріал		50		Механічні частки		84,5	
				Використаний фільтрувальний матеріал	50		
				Конденсат	10		
				Втрати (0,5%)	5.5		
Всього	1150			Всього	1150		
ДР.3 Підготовка упаковки							
Пластикові баночки			10	Підготовлені пластикові баночки			10
Пластикові корки			10	Підготовлені пластикові корки			10
Всього			40	Всього			20
Стадія ДР 4 Підготовка поживного середовища							

Продовження Таблиці 4.2

М'ясний екстракт	0,8			Поживне середовище Втрати (5%)		10,45	
Дріжджовий екстракт сухий	0,5						
Цитрат амонію	0,2						
Ацетат натрія	0,5						
Глюкоза	2					0,55	
Сульфат маргану	0,005						
Сульфат магнію	0,002						
Агар-агар	1,2						
Дигідрофосфат калію	0,2						
Вода питна		5,59					
Всього	11			Всього	11		
ДР5 Підготовка захисного середовища							
Казеїн	2,85			Захисне середовище		12	
Вода питна		11		Втрати 1%		1,38	
Всього		13,85		Всього		13,85	
Стадія ТП 6 Вирощування посівного матеріалу							
Поживне середовище		10,45		Інокулят Втрати (2%)		15,45	
Розмножена культура продуценту з лабораторії		5				0,34	
Всього	15,45			Всього	15,1		
Стадія ТП 7 Приготування закваски							
Бактеріальна маса		15,1		Закваска		689,43	
Молоко		685		Втрати (2%)		10,568	
Всього	700			Всього	700		
Стадія ТП 8 Концентрування							
Закваска		689,43		Концентрат закваски		10	
				Сироватка		672,08	

Продовження Таблиці 4.2

				Втрати (2%)		13,92	
Всього	689,4			Всього	689,4		
Стадія ТП 9 Змішування зі захисним середовищем							
Концентрат закваски	10			Концентрат закваски зі захисним розчином	20		
Казеїн	10			Втрати(1%)	0,2		
Всього	20			Всього	19,8		
ТП 10 Ліофільне висушування бактеріального концентрату							
Концентрат закваски	19,8			Сухий концентрат закваски	11		
				Конденсат	8,41		
				Витрати продукту(2%)	0,39		
				Технологічні витрати	2		
Всього	19,8			Всього	19,8		
ТП 11 Гомогенізація							
Концентрат закваски	11			Гомогенізований концентрату заквасаски	10,56		
Всього	11			Втрати 4%	0,44		
				Всього	11		
Стадія ПМВ 12 Фасування та пакування продукту							
Пластикові баночки, місткість 100 г			10	Розфасований та упакований продукт	30		
Пласмасові корки			10	Втрати при фасуванні 5%	0,56		
Сухий бактеріальний концентрат закваски	10,56						
Всього	30,56			Всього	30,56		

4.5. Контроль виробництва

Таблиця 4.3. Перелік контрольний точок

Назва стадії та номер контрольної точки	Об'єкт контролю та показник, що вивчається	Метод контролю	Періодичність перевірки	Нормативна характеристика показника
ДР1.1 Підготовка персоналу	Навчання Спецодяг	Компетентність Чистота	Періодично По мірі забруднення	Достатній рівень компетенції Чистота
ДР1.2.Приготування дезинфікуючих, миючих	Розчин NaOH, Кількість NaOH Хлорне вапно, кількість $\text{Ca}(\text{ClO})_2$	Ваги, мірний посуд, візуально Ваги, мірний посуд, візуально	Кожну операцію Кожну операцію	1% 2%
ДР1.3 Підготовка обладнання та кумонікацій	Ступінь чистоти, вміст мікроорганізмів та часток Герметичність	Візуально Мазки з внутрішніх та зовнішніх поверхонь Або використання тест системи. Метод омилання.	Кожну операцію	Стерильні Герметичні
ДР2. Підготовка повітря	Ступінь чистоти, вміст мікроорганізмів та часток	Мікробна контамінація (проба повітря КУО/м ³) Седиментаційний метод	Кожну операцію	Не повинно бути життєздатних мікроорганізмів, та максимально допустиме число часток

Продовження Таблиці 4.3

		(седиментація на пластинку КУО/м ³)		в 1м ³ повітря 200. Е = 95 %
ДР 3. Підготовка упаковки	Режим стерилізації	Термометр Манометр Візуально Мікробіологічна чистота	Кожну операцію	t=125°C, P=0,1МПа, T=30хв.Відсутність сторонньої мікрофлори
ДР 4. Підготовка та стерилізація поживних середовищ	Режим стерилізації	Термометр Манометр Візуально Мікробіологічна чистота	Кожну операцію	t=125°C, P=0,1МПа, T=30хв.Відсутність сторонньої мікрофлори
ДР 5. Підготовка захисного середовища	Ступінь чистоти Маса	Ваги	Кожну операцію	t=125°C, P=0,1МПа, T=15хв.Відсутність сторонньої мікрофлори
ТП6.Вирощування посівного матеріалу	Режим культивування. Температура	Термометр, візуально	Кожну операцію	t= 45°C
ТП7.1.Підготовка та кип'ятіння молока	Режим кип'ятіння Режим обезжирення	Термометр Візуально	Кожну операцію	t=95°C, T=30-45хв, C(ср)=12% Відсутність сторонньої мікрофлори
ТП7.2. Культивування	Режим культивування. Температура	Термометр, візуально	Кожну операцію	n=200об/хв, pH=5,0-4,2; t=45°C; T= 7-8год.

Продовження Таблиці 4.3

ТП7.3 Охолодження	Температура	Термометр, візуально	Кожну операцію	$t=5^{\circ}\text{C}$, $T=5-10\text{хв}$
ТП10. Ліофільна сушка	Температура час	Термометр, візуально	Кожну операцію	$t=30^{\circ}\text{C}$, $P=10\text{Па}$ $T=24\text{год}$
ТП11. Гомогенізація	Однорідність	Візуально	Кожну операцію	$D=0,09-0,095\text{мм}$
ПМВ.12 Фасування та пакування	Маса Стерильність	Ваги визначення (проба повітря $\text{КУО}/\text{м}^3$) Седиментаці йний (седиментаці я на пластинку $\text{КУО}/\text{м}^3$)	Кожну операцію	20шт Не повинно бути життєздатних мікроорганізм ів, та максимально допустиме число часток в 1м^3 повітря 200.

РОЗДІЛ 5. РОЗРАХУНОК ОБЛАДНАННЯ ДЛЯ ПРОВЕДЕННЯ ТЕХНОЛОГІЧНОГО ПРОЦЕСУ

5.1. Обґрунтування вибраної конструкції ферментеру для виготовлення закваски. Підбір конструкційних матеріалів для окремих елементів апарату

Вирощування продуцентів *S. thermophilus* та *L. delbrueckii subsp. Bulgaricus* здійснюється періодичним, глибинним способом в біохімічних ферментерах. Культивування відбувається в анаеробних умовах. Ферментери - це ємності, камери, в яких відбувається вирощування мікроорганізмів в рідких поживних середовищах. Ферментер виготовляють з високоякісної нержавіючої сталі, для того щоб, він не піддавався корозії і не виділяв в середовище токсичні солі металів. Всі форми і види ферментативних систем створюються, маючи основною метою забезпечення однакових умов для всіх компонентів вмісту реактора. У ферментерах біокаталізатори суспендовані в рідкому середовищі, що містить необхідні субстрати для забезпечення зростання організмів і утворення потрібного цільового продукту.

До матеріалів, що використовуються при конструюванні ферментерів, пред'являються певні вимоги :

- а) всі матеріали, що вступають в контакт з розчинами, що подаються в біореактор, що стикаються з культурою мікроорганізму, повинні бути стійкими до корозії, щоб запобігти забруднення металами ;
- б) матеріали повинні бути нетоксичним і, щоб вони не могли б пригнічувати ріст культури;
- в) компоненти і матеріали біореактора повинні витримувати повторну

стерилізацію парою під тиском;

г) перемішуюча система біореактора і місця надходження і виходу матеріалів і продуктів повинні бути легко доступними та досить міцними, щоб не деформуватися при механічних впливах. Для виробничого культивування заквасок можна застосовувати такі види ферментерів: апарати з механічним перемішуванням, Апарати з пневматичним перемішуванням, апарати з циркуляційним перемішуванням.

Апарати з механічним перемішуванням

Ці реактори мають механічну мішалку з центральним валом і лопатями, число яких зазвичай дорівнює 6, рідше 8 . У систему входять також відбивні перегородки - вузькі металеві пластинки, прикріплені до внутрішніх стінок біореактора Рисунок [89] .

а) Мішалки лопатевого типу.

Лопатевими мішалками називають пристрої, які складаються лопатей, які закріплені на валу. Основні переваги лопатевих мішалок - простота пристрою та невисока вартість виготовлення. До недоліків мішалок цього типу слід віднести низьку насосну дію мішалки, який не забезпечує достатньо повного перемішування в усьому об'ємі апарату. Тому лопатеві мішалки застосовують для перемішування рідин, в'язкість яких не перевищує $10^3 \text{ мн} \cdot \text{с} / \text{м}^2$ [90].

б) Пропелерні мішалки.

Робочою частиною пропелерної мішалки являється пропелер – пристрій з декількома фасонними лопатями. Пропелерні мішалки застосовують для перемішування рідин в'язкістю не більше $2 \cdot 10^3 \text{ мн} \cdot \text{с} / \text{м}^2$, для розчинення, створення мало в'язких емульсій, гомогенізації великих об'ємів рідини [91].

в) Турбінні мішалки.

Ці мішалки мають форму коліс водяних турбін з плоскими, нахиленими або

					ДП 6109. 00.000 ПЗ	Арк.
4						75
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

криволінійними лопатями, закріпленими на вертикальному валу. Турбінні мішалки забезпечують інтенсивне перемішування в усьому об'ємі апарату[92].

Апарати з пневматичним перемішуванням

У такого типу апаратах мішалка відсутня і перемішування рідини здійснюється бульбашками газу. Швидкість масообміну в них набагато нижче, ніж в ферменторах з механічним перемішуванням. Класичним апаратом такого типу є ерліфтний реактор. Біореактори з пневматичним перемішуванням характеризуються більш плавним перемішуванням вмісту і набули поширення при вирощуванні клітин тварин і рослин. Пневматичні апарати привертають також простотою конструкції і малими енерговитратами. Основний їх недолік - "тихохідність" [93].

Недоліком цього виду ферментатора є порівняно низька величина робочого об'єму, особливо при роботі з сильно пінливими середовищами. Вони застосовуються в тих випадках, коли культура мікроорганізму не потребує інтенсивному перемішуванні і її в'язкість невелика. [94].

Апарати з циркуляційним перемішуванням

Біореактори циркуляційного або гідродинамічного типу оснащені насосами і ежекторами, що створюють спрямований потік рідини по замкнутому контуру. Ці апарати відрізняються простотою конструкції і надійністю в експлуатації [95].

Циркуляційне перемішування застосовують переважно для малов'язких середовищ за необхідності інтенсифікувати процеси теплообміну і масопереносу або підтримувати частинки твердої фази в завислому стані [96]. Даний тип ферментерів складно застосовувати для культивування мікроорганізмів у стерильних умовах через труднощі герметизації циркуляційних насосів. Але такі його переваги, як простота пристрою, велика ємність, забезпечення інтенсивності аерації і масообміну без перемішування,

					ДП 6109. 00.000 ПЗ	Арк.
4						77
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

					ДП 6109. 00.000 ПЗ	Арк.
4						77
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

Невідомою частиною будь-якого ферментера є сорочка, що забезпечує нагрівання, або охолодження речовин, що знаходяться у біореакторі. Розрізняють такі види:

-Сорочка з півтруб

-Гладка приварна сорочка

-Сорочка з вм'ятинами

-З'ємна сорочка

-З електронагрівачем.

В даній роботі буде доцільно використати гладку приварну сорочку.

Забезпечення необхідного рівня асептики в процесі біосинтезу залежить від засобів герметизації ферментера. Найбільш вразливим місцем для герметизації у ферментерів з комбінованим введенням енергії є місце введення валу мішалки в ферментер[99].

Для забезпечення асептичності біосинтезу в якості герметизуючого пристрою валів, що обертаються використовують торцеві ущільнення з паровим захистом. Торцеві ущільнення є невід'ємною частиною ферментерів з комбінованим введенням енергії, які працюють в асептичних умовах.

Торцеві ущільнення випускає Держинськхіммаш для герметизації валів апаратів, що працюють при надлишковому тиску до 0,25 МПа, температурі середовища – від 30 до 250 С та швидкості обертання валу до 10 с⁻¹.

Виготовляється шість типів торцевих ущільнювачів: ТД-6, ТДП, ТДМ, ТДПЗ, ТТ, ТСК (ТД – подвійне, ТДП –подвійне з вбудованим підшипником, ТДМ – подвійне для малогабаритних апаратів, ТДПЗ – подвійне з підшипником і захистом, ТСК –одинарне з сальником з корозійностійкої сталі. торцеві ущільнення, що контактують з поживним середовищем, виготовляються із сталі Х18Н10Т і Х17Н13М2Т, а також з титану

					ДП 6109. 00.000 ПЗ	Арк.
4						78
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

ВТ1.Тривалість безвідказної роботи – не менше 2000 годин. Припустиме биття валу в зоні торцевого ущільнення - не більше 9,25 мм, кутове биття валу – не більше 0,25 мм.

В біотехнологічних виробництвах де існують високі вимоги до рівня асептики використовують торцеві ущільнювачі типа ТТ з термічним затвором. Корпус ущільнювача заповнюють високов'язким авіаційним маслом МС-20 або МК 22, яке створює термічний затвор і змащує тертьові пари. Корпус ущільнювача має сорочку, в яку подається пара для стерилізації.

При експлуатації торцевого ущільнювача потрібна циркуляція запорної рідини (масла).Для цього використовують природну циркуляцію масла. В цій схемі залучені теплообмінник та фільтр масла. Технічна характеристика торцевих ущільнювачів, типа ТТ для вертикальних валів, які працюють при надлишковому тиску 0,3 МПа і залишковому – 0,02-0,03МПа представлена в таблиці.

Отже, для даної технології виробниче культивування продуцента проводиться у ферментерах об'ємом від 1000-2500 л. Тобто об'єм для культивування відносно невеликий, а значить найкраще використовувати механічний ферментер. Біосинтез відбувається при надлишковому тиску повітря біля 20-30 кПа у ферментері. Як було сказано вище, саме ферментери з механічним перемішуванням є підходящими для роботи при підвищеному тискові. Переваги цих апаратів в їх мобільності тому, що в них може бути створений будь який оптимальний для біологічного агента гідродинамічний режим за рахунок зміни швидкості обертання мішалки, швидкості циркуляції рідини, яку перекачує насос.Враховуючи,що поживне середовище має невисоку вязкість і процес біосинтезу потребує інтенсивного перемішування доцільно використовувати лопатеву мішалку.

5.2. Технологічний, конструктивний, гідравлічний розрахунки

Принцип роботи апарату

					ДП 6109. 00.000 ПЗ	Арк.
4						80
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

Через патрубок молоко надходить у внутрішню ванну. Як тільки сирий продукт досягає максимального рівня наповнення, подача молока автоматично припиняється. Мішалка, яка обертається від приводу, поступово переміщує рідину в ванні для створення рівномірної маси. На дні ванни, з зовнішньої сторони, розташований змієвик, куди подається пар. З його допомогою молоко нагрівається до необхідної температури для пастеризації. Після пастеризації подається холодна вода, яка охолоджує молоко до температури, необхідної для сквашування. Потім в резервуар заливають культури молочнокислих бактерій.

Температура сквашування підтримується так довго, скільки необхідно для виробничої технології - всі параметри задаються на пульті управління. Пристрій дозволяє охолодити приготовану закваску до 3-10 ° С за допомогою холодоагента для подальшого зберігання. Крім вищеописаної послідовності, в заквасок установці можна нагріти або охолодити будь-який молочний продукт, або використовувати для охолодження спеціальні охолоджувачі молока.

Технологічні параметри роботи:

1. Номінальний об'єм, л- 1000
2. Коефіцієнт заповнення-0,7
3. Внутрішній діаметр , мм-1000 ± 1,5
4. Тип перемішуючого пристрою-турбінна
5. Кількість мішалок -1
6. Частота оберту мішалки - 2,02 об/хв
7. Температура, °С:

культуральної рідини на вході в апарат	30
культуральної рідини на виході з апарату	45
води на вході в апарат	55
води на виході з апарату	25
8. Потужність електродвигуна, кВт- 132кВт

9. Габаритні розміри, мм:

ширина 1000

висота 1550

довжина 1450

10. Маса, кг 365

Конструктивний розрахунок

1. Розраховуємо робочий об'єм апарату:

$$V_p = V_n \cdot K_z$$

$$V_p = 1000 \cdot 0.7 = 700 \text{ л} = 0.7 \text{ м}^3$$

2. Внутрішній діаметр апарату :

$$D_{\text{вн}} = 1000 \pm 1,5 \text{ мм} = 1,0 \text{ м}$$

3. Розраховуємо висоту еліптичної частини днища ферментера.

$$h_{\text{ел}} = 0.25 \cdot D_{\text{вн}}$$

$$h_{\text{ел}} = 0.25 \cdot 1.0 = 0.25 \text{ м} = 250 \text{ мм}$$

Решту конструктивних розмірів днища апарату знаходимо за ГОСТ 6533-78, так як еліптичні днища є стандартними виробами:

Було обрано апарат з еліптичним днищем і еліптичною знімною кришкою (тип 0). За ГОСТ 20680–86 приймаємо внутрішній діаметр апарату [100]:

$$D_{\text{вн}} = 1000 \pm 1,5 \text{ мм} = 1,0 \text{ м}$$

Висота корпусу: $H = 1450 \text{ мм} = 1,450$

площа поверхні сорочки $F = 5,8 \text{ м}^2$.

Оскільки еліптичні днища є стандартними виробами, то за ГОСТ 6533-78

					ДП 6109. 00.000 ПЗ	Арк.
4						81
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

знаходимо решту конструктивних розмірів днища апарату [14]:

- Внутрішня поверхня еліптичного днища : $F_{ен}=1.16м^2$
- Висота основи еліптичного днища : $h_1=0,025м=25мм$
- Висота відбортової частини: $h=2S=2*5=10мм$
- Товщина стінки еліптичного днища : $S=5 мм$
- Об'єм еліптичного днища : $V_{дн}=149,9дм^3=0,1499м^3$
- Маса днища : $m=46,2кг$
- Висота обичайки: $h_{о.дн}=25мм$
- Повна висота днища : $h_{дн} = h_{ел.дн} + h_{о.дн} = 0.25 м + 0,025м = 0.275м=2760мм$
- Повний об'єм реактора : $V = V_{ц} + 2 \cdot V_{дн} = 1000л = 1м^3$

Звідси об'єм циліндричної частини:

$$V_{ц} = V_p - 2V_{дн} = 1 м^3 - 2 \cdot 0,14995м^3 = 0,7 м^3 = 700 л$$

- Висота циліндричної частини апарату:

$$H_{ц} = V_{ц} / F = 4 \cdot V_{ц} / \pi \cdot D_{вн} = (0,7м^3 \cdot 4) / (3,14 \cdot 1) = 0,89м = 890мм$$

- Загальна висота ферментера:

$$H_{заг} = H_{ц} + 2(h_{ел} + h) = 0,89м + 2(0.25 + 0.01) = 1,450м = 1450мм$$

- Висота рідини в апараті:

$$H_p = 4 \cdot (V_p - V_{дн}) / (\pi \cdot D_{вн}^2 + h_{дн})$$

$$H_p = 4 \cdot (0,7 - 0,1499) / (3,14 \cdot 1 + 0.275) = 2,2 / 0,8635 = 1,55$$

Розрахунок перемішуючого пристрою

Згідно з даними, представленим в ГОСТ 20680 -7 нормалізований реактор з

					ДП 6109. 00.000 ПЗ	Арк.
4						82
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

номінальним об'ємом 1 м³ має діаметр D = 1000 мм. Приймаємо відношення D / d м = 1,6, отримуємо діаметр мішалки d м = 1000/1,6 = 600 мм. На підставі даних табл. ГОСТ 20680 -7 остаточно приймаємо dм = 630 мм. Прийmemo окружну швидкість мішалки ω = 4 м / с. В цьому випадку частота обертання мішалки[101]:

$$n = \omega / (\pi d_m)$$

$$n = 4 / (3,14 * 0,63) = 2,02 \text{ с}^{-1}$$

$$n_{\min} \geq C_1 \cdot \left(\frac{D \cdot \delta \cdot \Delta \rho}{d_m^4 \cdot \rho_{жс}} \right)^{0,5}$$

$$n_{\min} \geq \left(\frac{1 \cdot 1,2 \cdot 10^{-3} (2500 - 1020)}{0,63^4 \cdot 1020} \right)^{0,5} = 0,1 \text{ с}^{-1}$$

Відповідно до цих даних по табл. ГОСТ 20680 -7 приймаємо частоту обертання мішалки n = 2,08 с⁻¹ (тихохідна мішалка).

Для визначення глибини воронки в посудині знайдемо значення параметрів Γ і Re_{цб}:

Відцентровий критерій Рейнольдса знаходимо по формулі:

$$Re_{цб} = (n * d_m^2 * \rho_{ж}) / \mu_{ж}$$

$$Re_{цб} = (2,08 * 0,63^2 * 1020) / 5,4 * 10^{-3} = 155937$$

$$\Gamma = 8H_{ж}/D + 1$$

$$\Gamma = 8 * 1,13 / 1 + 1 = 6,77$$

$$E = \Gamma / (\xi_m z Re_{цб}^{0,25})$$

$$E = 6,77 / (0,56 * 1 * 155937^{0,25}) = 0,61$$

Глибина воронки:

$$h_B = B * n^2 * d_m^2 / 2$$

					ДП 6109. 00.000 ПЗ	Арк.
4						83
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

$$h_b = 10 \cdot 2,08^2 \cdot 0,63^2 / 2 = 0,8 \text{ м}$$

При установці мішалки на висоті $h = 0,5d_m = 0,5 \cdot 0,63 = 0,315 \text{ м}$, допустима глибина воронки:

$$h_{пр} = H_{ж} - h$$

$$h_{пр} = 1,13 - 0,315 = 0,815 \text{ м.}$$

В апараті слід встановлювати відбивні перегородки.

Для вибору торцевого ущільнення розрахуємо попередньо діаметр вала мішалки:

$$d_b = C \cdot d_m$$

$$d_b = 0,166 \cdot 0,63 = 0,1046 \text{ м.}$$

$$\text{де } C = 0,166$$

Прийmemo діаметр вала $d_b = 95 \text{ мм}$. Вибираемо торцеве ущільнення ТСК(одинарне).

Потужність, що втрачається в торцевому ущільненні:

$$N_{ущ} = 6020 \cdot d_b^{1,3}$$

$$N_{ущ} = 6020 \cdot 0,095^{1,3} = 282,2 \text{ Вт.}$$

Критерій потужності залежить від інтенсивності перемішування і характеризується відцентровим критерієм Рейнольдса. При $Re = 155937$ $K_N = 0,3$. У цьому випадку потужність, що витрачається на перемішування, буде дорівнює:

$$N = K_N \cdot \rho_{ж} \cdot n^3 \cdot d_m^5$$

$$N = 0,3 \cdot 1020 \cdot 2,08^2 \cdot 0,63^5 = 131 \text{ Вт.}$$

Кінцеву розрахункову потужність визначаємо за формулою:

$$K'_m = K_n \cdot N_m = 1,55 \cdot 131 = 203 \text{ Вт}$$

					ДП 6109. 00.000 ПЗ	Арк.
4						84
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

Вибираємо в якості приводу мішалки мотор-редуктор типу МПО-1 з потужністю електродвигуна $N = 0.75 \text{ кВт}$. $K_n = H_p/D = 1,55/1 = 1,55$.

Розрахунок теплового навантаження ферментера

Метою розрахунку є визначення теплового потоку, який необхідно відводити водою під час роботи ферментера.

Теплота реакції є різницею ентальпій продукту та компонентів кДж/моль[102]:

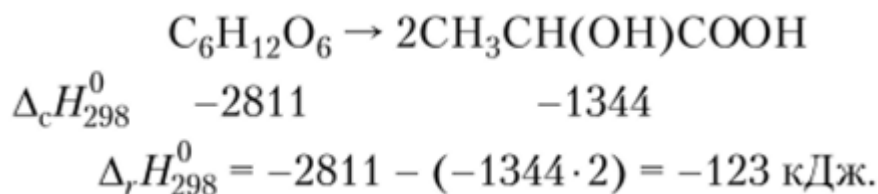
$$Q_p = \Delta H = H_{\text{прод}} - H_{\text{комп}}$$

де сумарна ентальпія продуктів реакції- $H_{\text{прод}}$, $H_{\text{комп}}$ -сумарна ентальпія

речовин, що беруть участь в реакції.



За довідником визначаємо ентальпії речовин, кДж/ моль:



- це екзотермічний процес

Тепловиділення на один кілограм поживних речовин складає:

$$Q_{\text{ц}} = Q_p / M(C_2H_5COOH) = -123 / 0,074 = -1662,16 \text{ кДж/ моль:}$$

Кількість біологічного тепла, що виділяється культурою:

$$Q_{\text{вид}} = (m_{\text{ц}} * Q_{\text{ц}} * 1000) / \tau * 3600 = 90 * (-1662,12) * 1000 / 7 * 3600 = -5936,14$$

Тепловий баланс ферментера має наступний вигляд:

					ДП 6109. 00.000 ПЗ	Арк.
4						85
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

$$Q = Q_{\text{вод.в}} + Q_{\text{пов}} + Q_{\text{впр}}$$

де вод.в $Q_{\text{вод.в}}$ - кількість теплоти, що відводиться водою, що протікає в оболоні ферментера

$Q_{\text{пов}}$ - кількість теплоти, що відводиться повітрям, (так як $t_{\text{пов}} \approx 25^\circ\text{C}$, то $Q_{\text{пов}}$ дуже незначна величина);

$Q_{\text{впр}}$ - теплота, що відводиться від поверхні оболоні ферментера

тепловипромінюванням, приймаємо 2% від Q :

$$Q_{\text{впр}} = 0,02 * (-5936,14) = -118,7 \text{ Вт}$$

Тоді тепло, що повинно відводитись водою:

$$Q_{\text{вод.в}} = Q_{\text{вид}} - Q_{\text{випр}} = -5936,14 + 118,7 = -5817,44 \text{ Вт}$$

Але ще треба враховувати потужність на перемішування, тому тепло, що відводиться водою дорівнює

$$Q_{\text{в}} = Q_{\text{вод.в}} + N = -5817,44 + 7500 = 1682,56 \text{ Вт}$$

Висновок: Тепловий потік, який необхідно відводити під час роботи ферментера дорівнює $Q_{\text{в}} = 1682,56 \text{ Вт}$. Цей потік необхідно відводити через поверхню теплообміну, яка повинна бути не меншою ніж та, що є в апараті.

Розрахунок поверхні теплообміну

Метою розрахунку є визначення площі поверхні теплообміну.

Вихідні дані: внутрішній діаметр оболонки апарата D_p , м 1,1;

товщина стінки корпуса апарата, м 0,005;

внутрішній діаметр апарата D , м 1;

частота обертання мішалки n , об/с 2,972;

діаметр мішалки d_m , м 0,63;

					ДП 6109. 00.000 ПЗ	Арк.
4						86
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

температура води при вході в оболонку t_1 , К 297 ;

температура води при виході з оболонки t_2 , К 315;

температура середовища t , К 318;

витрата рідини Q_v , Вт 1682,56

Більша різниця температур:

$$\Delta t_6 = t - t_1 = 318 - 297 = 21 \text{ К}$$

Менша різниця температур:

$$\Delta t_m = t - t_2 = 318 - 315 = 3 \text{ К}$$

Середній температурний напір:

$$\Delta t_6 / \Delta t_m = 21/3 = 7 \geq 2 = \Delta t_{\text{сер}} = \frac{\Delta t_{\text{бiльшe}} - \Delta t_{\text{мен}}}{\ln\left(\frac{\Delta t_6}{\Delta t_m}\right)} = \frac{18}{1,94} = 9,27 \text{ К}$$

Температура стінки апарату:

$$t_{\text{ст}} = \frac{t - t_{\text{сер}}}{2} = \frac{318 - 9,27}{2} = 154,3 \text{ К}$$

Теплофізичні властивості молока обезжиреного ($\mathcal{K}=3\%$) з концентрацією сухих речовин 8,2% , прийняті при середній температурі 318 К:

$$\rho_c = 1055,7 - 0,179T + 3,14 \text{ ОСВ} = 1055,7 - 0,179 \cdot 318 + 0,082 = 1015,03 \text{ кг/м}^3$$

$$\mu_c = 1160 \cdot 10^{-3} \text{ Па} \cdot \text{с}$$

$$\nu_c = 0,837 \cdot 10^{-3} \text{ м}^2/\text{с}$$

$$c_c = 3970 \text{ Дж/кг} \cdot \text{К}$$

$$\lambda_c = 0,575 \text{ Вт/м} \cdot \text{К}$$

Визначення для апаратів з оболонками при перемішуванні мішалкою

					ДП 6109. 00.000 ПЗ	Арк.
4						87
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

коефіцієнту тепловіддачі від середовища до стінки апарата:

Критерій Рейнольдса при перемішуванні:

$$Re = \frac{\rho_{nc} \cdot n \cdot d_m^2}{\mu_{nc}} = \frac{1015 \cdot 2,97 \cdot 0,63^2}{1160 \cdot 10^{-6}} = 1031439$$

Критерій Прандтля:

$$Pr = \frac{c \cdot \mu}{\lambda} = 5,85$$

Критеріальне рівняння для визначення критерію Нусельта процесу тепловіддачі від середовища до стінки апарата:

$$Nu = 0,36 \cdot Re^{0,67} \cdot Pr^{0,33} \cdot (\mu_p / \mu_{ст})^{0,14} = 0,36 \cdot 1\,031\,439^{0,67} \cdot 5,85^{0,33} \cdot (1,16 \cdot 10^{-3} / 1,3 \cdot 10^{-3}) = 6\,756$$

Коефіцієнт тепловіддачі:

$$\alpha_1 = \frac{Nu \cdot \lambda_{nc}}{D} = \frac{6756 \cdot 0,575}{1} = 3884,7 \text{ Вт/(м}^2 \text{ К)}$$

Визначення для апаратів з оболонками при перемішуванні мішалкою коефіцієнту тепловіддачі від стінки ферментера до рідини:

Площа перетину оболонки:

$$f = \frac{\pi \cdot (D^2 - (D + 2 \cdot \delta)^2)}{4} = \frac{\pi(1,1^2 - (1 + 2 \cdot 0,005)^2)}{4} = 0,14 \text{ м}^2$$

Витрата води:

$$G_B = \frac{Q_\epsilon}{C_\epsilon \cdot (t_2 - t_1)} = \frac{1682,56}{4180 \cdot 18} = 0,022 \text{ кг/с}$$

					ДП 6109. 00.000 ПЗ	Арк.
4						88
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

Швидкість води в оболоні ферментера:

$$W = G_B / f \cdot \rho_B = 0,022 / 0,14 \cdot 988 = 0,00015 \text{ м/с}$$

Критерій Рейнольдса:
$$Re = \frac{w \cdot d \cdot \rho}{\mu} = \frac{0,00015 \cdot 0,072 \cdot 1015}{1,1 \cdot 10^{-3}} = 9,9$$

Оскільки критерій Рейнольдса дорівнює 9,9, то це ламінарний режим. Тоді розрахунок ведеться для ламінарного режиму. Спочатку визначимо коефіцієнт тепловіддачі не враховуючи конвекцію:

Критерій Прандтля:

$$Pr_2 = \frac{\mu_p \cdot C_p}{\lambda_p} = \frac{1,1 \cdot 10^{-3} \cdot 4,18}{0,572} = 8,038$$

Критеріальне рівняння для визначення критерію Нусельта процесу тепловіддачі від середовища до стінки апарата:

$$Nu = 1,55 \cdot \left(Re \frac{d}{H_p} \right)^{1/3} \cdot \left(\frac{\mu_p}{\mu_{cm}} \right)^{0,14} = 1,55 \cdot \left(9,9 \frac{0,176}{1,55} \right)^{1/3} \cdot \left(\frac{1,1 \cdot 10^{-3}}{0,928 \cdot 10^{-3}} \right)^{0,14} = 1,19 \cdot 1,02 = 1,22$$

Коефіцієнт тепловіддачі:

$$\alpha_2 = \frac{Nu \cdot \lambda_p}{H_p} = \frac{1,22 \cdot 0,572}{1,55} = 0,45 \frac{\text{Вт}}{\text{м}^2 \cdot \text{К}}$$

Так, як α_2 вийшло маленьке тоді в рубашку ми добавимо перегородки розмірами $b = 0,03$ м та $l = 0,34$ м та робимо перерахунок.

Швидкість між перегородками:

$$w = \frac{G_B}{(b \cdot l) \cdot \rho_B} = \frac{0,022}{(0,03 \cdot 0,34) \cdot 999,74} = 0,029 \frac{\text{м}}{\text{с}}$$

Еквівалентний діаметр:

$$d_B = \frac{4(b \cdot l)}{2(b + l)} = \frac{0,0102}{0,74} = 0,0137 \text{ м}$$

					ДП 6109. 00.000 ПЗ	Арк.
4						89
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

Критерій Рейнольдса:

$$Re = \frac{w \cdot d_B \cdot \rho_p}{\mu_p} = \frac{0,029 \cdot 0,0551 \cdot 999,74}{1,1 \cdot 10^{-3}} = 1452$$

$$Nu = 0,021 \cdot Re^{0,8} \cdot Pr_2^{0,43} \cdot (\mu_p / \mu_{ст})^{0,25}$$

$$Nu = 0,021 \cdot 1452^{0,8} \cdot 8,038^{0,43} (1,1 \cdot 10^{-3} / 0,928 \cdot 10^{-3})^{0,25} = 17$$

Коефіцієнт тепловіддачі:

$$\alpha_2 = \frac{Nu \cdot \lambda_p}{d} = \frac{17 \cdot 0,572}{0,0551} = 176 \frac{Вт}{м^2 \cdot К}$$

Тоді коефіцієнт теплопередачі знайдемо з рівняння:

$$K_p = \frac{1}{\frac{1}{\alpha_1} + \frac{\delta}{\lambda} + \frac{1}{\alpha_2}} = \frac{1}{\frac{1}{3884} + \frac{0,005}{15} + \frac{1}{176}} = 159 \frac{Вт}{м^2 \cdot К}$$

Площа поверхні теплообміну ферментера:

$$F = Q / K \cdot t_{cp} = 1682,56 / 159 \cdot 9,27 = 1,14 м^2$$

Максимальна площа поверхні, яка є в ферментері:

$$F = \pi(D + 2\delta)H_p = 3,14(1 + 2 \cdot 0,005)1,55 = 4,9 м^2$$

Необхідна площа поверхні теплообміну дорівнює $F = 1,14 м^2$, а максимальна площа поверхні, яка є в ферментері дорівнює $F_{max} = 4,9 м^2$.

Висновок: Отже поверхня теплообміну в $1,14 м^2$, що є в апараті достатня для того, щоб відводити тепловий потік $Q_{вод} = 1682,56 Вт$.

Розрахунок гідравлічного опору

Мета розрахунку: розрахувати втрати тиску в оболоні.

Вихідні дані:

					ДП 6109. 00.000 ПЗ	Арк.
4						90
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

втрата води V , м³/с 0,000302;

критерій Рейнольдса Re 9,9;

швидкість води w , м/с 0,029;

висота оболоні H_p , м 1,55;

густина води ρ , кг/м³ 999,74;

внутрішній діаметр оболонки апарата D_p , м 1,1;

товщина стінки корпусу апарата δ , м 0,005;

внутрішній діаметр апарата D , м 1;

Втрата тиску на створення швидкості потоку :

$$\Delta P_{\text{шв}} = W^2 \rho / 2 = 0,0302^2 \cdot 999,74 / 2 = 0,551 \text{ Па}$$

Втрата тиску на прямій ділянці:

$$\Delta P_{\text{тр}} = \lambda \frac{H_p}{d_s} \cdot \frac{w^2 \rho}{2} = 1,0174 \frac{1,55}{0,084} \cdot \frac{0,0302^2 \cdot 999,74}{2} = 10,34 \text{ Па}$$

Де $d = 0,084$ – еквівалентний діаметр, м;

$$\lambda = \frac{64}{Re} = \frac{64}{9,9} = 6,46$$

-коефіцієнт тертя, який залежить від режиму руху

течії.

Втрата тиску на місцеві опори:

$$\Delta P_{\text{мс}} = \sum \xi \cdot \frac{w^2 \cdot \rho}{2} = (0,81 + 0,45) \cdot 0,551 = 0,695 \text{ Па}$$

де $\sum \xi = \xi_p + \xi_z$ – сума коефіцієнтів місцевого опору 0,81 для розширення та

0,45 для звуження. Втрата тиску на підняття рідини:

					ДП 6109. 00.000 ПЗ	Арк.
4						91
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

$$\Delta P_{\text{під}} = \rho g H_p = 999,74 \cdot 9,81 \cdot 3 = 36629,464 \text{ Па}$$

Сумарна втрата тиску:

$$\Delta P = \Delta P_{\text{шв}} + \Delta P_{\text{тр}} + \Delta P_{\text{мс}} + \Delta P_{\text{під}} = 0,551 + 10,34 + 0,695 + 36629,464 = 36\,641,05 \text{ Па}$$

Потужність, яка споживається насосом:

$$N = V \Delta p / 1000 \eta = 0,000302 \cdot 36\,641,05 / 1000 \cdot 0,6 = 0,0184 \text{ кВт.}$$

Висновок: таким чином втрати тиску у оболоні складають 36 641,05 Па.

Потужність, яка необхідна для переміщення рідини $N = 0,0184$ кВт.

5.3. Вибір загальнозаводського обладнання

Виберемо фільтр для очистки вуглекислого газу, що подається для створення тиску у ферментер. Для стерилізації повітря застосовують корпуса фільтрів ДХО з нержавіючої сталі з фільтроелементами з пористого фторопласта, а також набивні фільтри з супертонким базальтовик волокном (ГОСТ 5013-81) чи скловолокном ВСО-6В (ГОСТ 10727-73). Для стиснення повітря застосовують турбонагрівачі чи компресори.

Завод CAMERON пропонує серію центробіжних компресорів для безперервних процесів, що проходять під тиском до 4 бар та мають необхідність у 100% безмасляному повітрі. Вибираємо компресор моделі ТАВ3000, який має наступні технічні характеристики [103]:

Максимальна продуктивність, м³/хв	Робочий діапазон тисків, бар	Діапазон встановлених потужностей, кВт	Габаритні розміри, мм	Маса, кг
17-340	0,8-5,9	45-910	1825x3404x1981	5700

Компанія Технофільтр пропонує фільтраційні елементи ЕПМ.Ф на основі двошарової гідрофобної фторопластової (PVDF+PTFE) мембрани з розміром пор 0,45-0,8 мкм. Розрахуємо дійсну витрати повітря за тиску 0,25МПа та температури 33°C:

$$V_n = V_{\text{пов}} \cdot \left(\frac{273+T}{273} \right) \cdot \frac{1}{P}$$

$$V_n = 0,84 \cdot \left(\frac{273+33}{273} \right) \cdot \frac{1}{2,5} = 0,377 \text{ м}^3/\text{с}$$

За швидкості повітря $w_{\text{пов}} = 3 \text{ м/с}$ площа перерізу фільтрувального матеріалу повинна становити:

$$F_{\text{пер/ф}} = \frac{V_n}{w_{\text{пов}}}$$

$$F_{\text{пер/ф}} = \frac{0,377}{3} = 0,126 \text{ м}^2$$

Виходячи з розрахованих величин вибираємо фільтраційний патрон ЕПМ.Ф045Д1125П [104].

5.4. Вимоги до охорони праці та навколишнього середовища

Техніка безпеки при культивуванні продуцентів

При немеханізованому виробництві значна кількість мікроорганізмів, їх спор та конідій потрапляють в повітря приміщень при підготовці інокуляту, її засіванні у виробниче середовище, вирощуванні в камерах, транспортуванні, вивантаженні, сушінні та фасуванні. Мікроорганізми, що використовують як продуценти, не є патогенними, але здатні викликати різні алергічні реакції. Тому вирощування посівної культури повинно бути механізовано та проводитися в стерильних умовах та герметично закритому обладнанні. Забезпечення посівною культурою мікробіологічних заводів повинно бути централізоване [105].

Очищення відходів мікробіологічної промисловості

Система охорони навколишнього середовища містить установки для очищення промивних вод, стічних вод, та повітряних викидів.

Очищення повітряних викидів від мікроорганізмів.

					ДП 6109. 00.000 ПЗ	Арк.
4						93
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

Очищення повітря від газових шкідливих домішок за характером протікання фізико-хімічних процесів здійснюється за такими 5 основними хіміко-технологічними групами методів: адсорбцією, абсорбцією, хемосорбцією, термічна нейтралізація, каталізація[106].

- Абсорбція використовується у тих випадках коли очищенню підлягають газови, наприклад – пари соляної кислоти, оксид сірки, аміак, оксид вуглецю. Суть методу полягає у поглинанні абсорбентами поллютантів, шляхом розчинення або зв'язування газів, що пропускають через них.
- Адсорбція, як метод очистки будується на властивостях окремих тонкодисперсних твердих тіл вловлювати в газах за певних умов неплтрібніам елементи[107]

Найчастіше очисні технології застосовують у комплексі цілого ланцюга або комбінації очисних агрегатів. Спочатку здійснюється грубе очищення в осадових камерах. На другому етапі газ проходить через циклон, а для високої ефективності очистки використовуються електричні, тканинні фільтри.

Метод хемосорбції базується на поглинанні газів твердими і рідкими поглиначами з утворенням слаболетючих або слабозрочинних хімічних з'єднань, які в результаті побічних перетворень дозволяють отримати корисний кінцевий продукт для цього найчастіше використовують скрубери Вентурі.

- Термічна нейтралізація- базується на здатності горючих токсичних компонентів окислятися до менш токсичних при наявності вільного кисню і високої температури газової суміші. Цей метод використовується у випадках, коли об'єми і концентрація викидів великі.
- Каталітичний метод використовують для перетворення токсичних компонентів промислових викидів у речовини нешкідливі чи менш шкідливі,

- чи нешкідливі для навколишнього середовища. Каталітичний метод базується на взаємодії речовин, що видаляються з одним з компонентів, який присутній в газі, що очищує, або з спеціально доданою в суміш речовиною. Каталізатор взаємодіє з одним з реагуючих сполук та утворює проміжну речовину яка розкладається з утворенням продукту регенованого каталізатора[108].

На основі цих методів розроблена велика кількість пристроїв і апаратів, при комплексному використанні яких може бути досягнуте високоефективне очищення пилогазових викидів. Вилучені з пилогазових викидів речовини звичайно є або готовим продуктом, або вторинною сировиною

Ще є такі заходи очищення повітряних викидів від мікроорганізмів як герметизація виробничих апаратів (ферментерів) флотаторів, сушарок та ін.), а також застосування циклонів, гідроциклонів, пилоосаджувальних камер, тканинних та електричних фільтрів, скрубєрів.

Очищення стічних вод.

Технологічний процес пов'язаний зі споживанням значної кількості води, що забруднюється шкідливими мікроорганізмами, мінеральними солями та органічними компонентами. У стічних водах знаходяться як нерозчинні, так і розчинні речовини. Забрудненість стічних вод оцінюється двома показниками: хімічним споживанням кисню (ХСК), тобто кількістю кисню (мг), достатньою для окиснення речовин в 1 дм³ стоків, та біологічним споживанням кисню (БСК), тобто кількістю кисню (мг), що споживають мікроорганізми на окислення органічних речовин в 1 дм³ стічних вод. Величину споживання кисню протягом 5 діб позначають БСК₅.

Існує декілька способів очищення стоків:

- механічне очищення (від нерозчинних у воді забруднень) використовують решітки, сита, гідроциклони, відстійники, піщані та сітчасті фільтри. Для освітлення поживних солей та середовищ, нейтралізаторів використовують гідроциклони;

					ДП 6109. 00.000 ПЗ	Арк.
4						95
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

- хімічне очищення. Відбувається шляхом додавання до стоків реактивів для осадження домішок або виділення газів;
- фізико-хімічне очищення (процеси коагуляції, флокуляції, сорбції, флотації та ін.). Як коагулятор застосовують сульфат алюмінію, широко використовують сорбцію (активоване вугілля);
- біологічне очищення ґрунтується на утилізації мікроорганізмами органічних речовин, що містяться в стоках. Для очищення від нафтопродуктів застосовують спеціальні уловлювачі

Посудини, що працюють під тиском

Всі посудини діляться на дві групи залежно від тиску. До першої групи відносяться посудини під тиском більше 0,07 МПа. До другої групи відносяться посудини до 0,07 МПа. Кожна посудина під тиском має свій паспорт, в якому зазначені дата виготовлення, завод-виробник, величина розрахованого та граничного тиску. У повітрі, що видаляється з апаратів для вирощування посівного матеріалу (інокуляторів), ферментерів, міститься значна кількість мікроорганізмів та шкідливих речовин, тому повітря необхідно очищувати [109].

Сушарки

В процесі сушіння, гранулювання та подрібнення виділяється значна кількість надто малих частинок порошку, що створюють з повітрям вибухонебезпечні та вогнєнебезпечні суміші. Недопустимі перегрівання, надлишкове тертя та утворення іскор у вентиляторі та опорах вала. Нагрівання сушарок рекомендується або гарячою водою, або паром. Для захисту від статичної електрики всі апарати або виготовлюють з електроізоляційного матеріалу або ретельно заземляють. Для запобігання вибуху та розриву стінок застосовують пристрої миттєвого вирівнювання тиску. При вирівнюванні тиску статичний тиск вибухового клапана не повинен перевищувати 9,6 кПа [108].

					ДП 6109. 00.000 ПЗ	Арк.
4						96
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

Висновки

1. У проєкті технології виробництва концентрату бактеріальної закваски для виготовлення кисломолочних продуктів обрано продуценти *L. delbrueckii TUA4408L* та *S. thermophilus ACA-DC 2*, які характеризуються високими технологічними показниками і генетичною стабільністю.
2. Проаналізовано методи селекції промислових-штамів продуцентів заквасок та запропоновано схему отримання продуценту шляхом селекційного добору за потрібними властивостями: продуктивність, стійкість до замерзання та стійкість до антибіотиків.
3. Враховуючи фізіолого-біохімічні особливості продуцентів *L. delbrueckii TUA4408L* та *S. thermophilus ACA-DC 2*, було обрано поживні середовища для отримання посівного матеріалу в інокуляторі –MRS (Ман, Рогоза, Шарп) та для виробничого біосинтезу – обезжирене молоко. Визначено раціональні параметри виробничого культивування: температура 45⁰С, рН-5,0-4,2; час культивування: 7-8год , надлишковий тиск 0,03 – 0,04 МПа, премішування 200об/хв.
4. Відповідно до фізико-хімічних та біологічних характеристик продукту, було складено технологічну схему виробництва концентрату бактеріальної закваски для кисломолочних продуктів.
5. Обґрунтовано вибір конструкції ферментера об'ємом 1000 л, з лопатевою мішалкою. Технологічний та конструктивний розрахунки підтверджують надійність та працездатність апарату.
6. У відповідності до вимог до готової форми та якості продукту, розроблено апаратурну схему виробництва сухого концентрату бактеріальної закваски в пласмасових баночках по 100г для виготовлення кисломолочної продукції.
7. Проектом передбачені заходи і засоби для виконання вимог щодо охорони праці та умов навколишнього середовища.

					ДП 6109. 00.000 ПЗ			
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата				
Розробила		Кічура М.А			Висновки	Стадія	Аркуш	Аркушів
Консульт.						Д	97	111
						КПІ ім. Ізгоря Сікорського ФБТ		
Керівник		Жолнер Л.Г						
Затвер.								

					ДП 6109. 00.000 ПЗ			
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата				
Розробила		Кічура М.А			Висновки	Стадія	Аркуш	Аркушів
Консульт.						Д	97	111
						КПІ ім. Ізгоря Сікарського ФБТ		
Керівник		Жолнер Л.Г						
Затвер.								